



Maria de Fátima da Silva Piloto

Licenciatura em Engenharia Química

**Procura de novos antibióticos. Síntese,
caracterização e determinação de
atividade biológica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientadora: Carla Patrícia Rosa

Doutorada, “Oxford University”, Reino Unido

“Elo de ligação”: Paula Sérgio Branco

Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade Nova de Lisboa

Presidente: Prof^ª. Doutora Ana Maria Ferreira da Costa Lourenço

Arguente: Prof^ª. Doutora Luísa Maria da Silva Pinto Ferreira

Maria de Fátima da Silva Piloto

Licenciatura em Engenharia Química

**Procura de novos antibióticos. Síntese,
caracterização e determinação de
atividade biológica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientadora: Carla Patrícia Rosa

Doutorada, “Oxford University”, Reino Unido

“Elo de ligação”: Paula Sérgio Branco

Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade Nova de Lisboa

Presidente: Prof^a. Doutora Ana Maria Ferreira da Costa Lourenço

Arguente: Prof^a. Doutora Luísa Maria da Silva Pinto Ferreira

Setembro, 2016

Procura de novos antibióticos. Síntese, caracterização e determinação de atividade biológica

Copyright © Maria de Fátima da Silva Piloto, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo seu esforço em me conceder oportunidades e incentivos para que eu chegasse até aqui e pela sua compreensão nos momentos alegres e difíceis na minha vida...

“Recomeçar...

Não importa onde nem quando se parou...

Em que momento da vida tudo se passou...

O que importa é que sempre é possível recomeçar.

Recomeçar é ter uma nova oportunidade,

É renovar as esperanças na vida e, o mais importante...

Acreditar que se é capaz e que tudo é possível.

Se pensarmos pequeno... Coisas pequenas teremos...

Mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor...

O melhor vai se instalar em nossa vida.

Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela força e oportunidades que me tem dado para vencer todos os meus desafios e dificuldades.

Agradeço ao Dr. João Serra e à Tecnimede que me receberam de braços abertos na área da síntese orgânica proporcionando-me todas as condições para o desenvolvimento desta Tese de Mestrado.

Um agradecimento muito especial à Dr.^a Carla Rosa pela compreensão, ajuda, e apoio dado.

Um agradecimento também muito especial à Dr.^a Paula Branco e a todos os Professores da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa pelo ensinamento ao longo do meu curso e que me conduziu até esta Tese de Mestrado.

Agradeço também à Dr.^a Ana Vanessa Simões e ao João Damil do Departamento de Química Fina pela colaboração, ajuda e apoio que me deram para concluir esta etapa.

Também um agradecimento para o Departamento de Microbiologia e Departamento de Cultura de Células da Tecnimede.

Agradeço aos meus colegas e chefes do Laboratório de Ensaaios – Química, onde exerço a minha atividade profissional diariamente, assim como a todos os meus outros amigos e colegas dentro e fora da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Resumo

As doenças infecciosas causadas por bactérias multi-resistentes continuam a ser a maior causa de morte a nível mundial. O aumento exponencial destas novas estirpes e a sua resistência aos antibióticos fez e faz necessária a investigação contínua com o objectivo de se desenvolverem novas moléculas e produzirem novos antibióticos. Nesse sentido, um número considerável de estruturas tendo como base funcional derivados de tioureias, foram sintetizadas e caracterizadas por ponto de fusão e espectroscopia de IV, RMN e HPLC-MS. A atividade anti-patogénica *in-vitro* das tioureias foi demonstrada com a presença de grupos funcionais eletroatratores, aminas aromáticas e heterocíclicos aromáticos e alifáticos de azoto sendo determinada a MIC₅₀ (concentração inibitória mínima a 50%) respetiva para bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*). Foram identificados dois *Hits* (composto 8 e composto 16) com atividade para *S.aureus*. A estrutura destes compostos não será divulgada no âmbito desta dissertação.

Abstract

Infectious diseases caused by multi resistant bacteria continue to be the leading cause of death worldwide. The exponential increase in these new strains and their resistance to antibiotics made necessary a continuing research with the aim of developing new molecules and produce new drugs. Accordingly, a number of structures having the thiourea functional group were synthesized and characterized by melting point, IR spectroscopy, NMR and HPLC-MS. The anti-pathogenic activity of these compounds has been demonstrated in vitro for aromatic, aliphatic and heteroaromatic amines in the presence of electron withdrawing groups (halogens). The MIC₅₀ (minimal inhibitory concentration required to inhibit 50% of growth) was determined for two different classes of bacterias, gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and gram-negative bacteria (*Escherichia coli*). Two hits were identified with activity for *S. aureus* (compound 8 and compound 16). The structure of these compounds will not to be discussed or disclosed in the context of this thesis.

Índice de figuras

Figura 1.1 - Alcalóides: morfina paclitaxel e quinina	1
Figura 1.2 - Cronologia do processo de descoberta de fármacos	2
Figura 1.3 - Etapas correspondentes ao desenvolvimento de novos fármacos.....	4
Figura 1.4 - Estrutura da penicilina	5
Figura 1.5 - Estrutura celular de uma bactéria	7
Figura 1.6 - Classes de compostos antibacterianos e o seu modo de ação nas bactérias.....	8
Figura 1.7 - Diferenças estruturais entre bactérias gram-positivas e gram-negativas....	8
Figura 2.1 - Estrutura química da tioureia	10
Figura 2.2 - Estruturas do monastrol, tioperamida, metamida, burimamida, capsazepine e tiopental	10
Figura 2.3 -Tautomerismo da tioureia	11
Figura 2.4 - Estrutura geral de 1-aroíl-3-aril-tioureas.....	12
Figura 2.5 - Compostos ativos para o tratamento do cancro de pulmão.....	13
Figura 2.6 - Compostos ativos no tratamento das células cancerígenas dos tumores cerebrais.....	13
Figura 2.7 - Compostos ativos no tratamento das células cancerígenas dos tumores cerebrais e pancreáticos.....	14
Figura 2.8 - Derivados de tioureas para o tratamento do HIV e TB	15
Figura 2.9 -Derivados da tioureia como antioxidantes.....	16
Figura 2.10 - Derivado da tioureia com atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i>	17
Figura 2.11 - Estrutura geral de isotiocianato de acilo.....	18
Figura 2.12 - Centros reativos dos isotiocianatos de acilo	18
Figura 6.1 - Espetro de RMN de ^1H do composto 13	43
Figura 6.2 - Espetro de HMBC para o composto 13.....	44
Figura 6.3 - Espetro de HSQC para o composto 13.....	44
Figura 6.4 - Espetro de RMN de ^{13}C do composto 13	45
Figura 6.5 - Espetro de infravermelho em KBr do composto 13	46

Índice de tabelas

Tabela 6.1 - Caraterização experimental das aciltioureas 1-5 segundo procedimento 5.2.1.1	36
Tabela 6.2 - Caraterização experimental das aciltioureas 7-10 segundo procedimento 5.2.1.2	37
Tabela 6.3 - Caraterização da amida obtida como subproduto no processo 5.2.1.1 ..	38
Tabela 6.4 - Caraterização experimental das tioureas 11-16 segundo procedimento 5.2.2.1 e 5.2.2.2	39
Tabela 6.5 - Deslocamentos químicos de ^1H -RMN (ppm) para o composto 13.....	42
Tabela 6.6- Deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN (ppm) para o composto 13.....	45
Tabela 6.7 - Resultados de estrutura atividade para as aciltioureas.....	48
Tabela 6.8 - Resultados de estrutura atividade para as tioureas.....	49
Tabela 6.9 - Resultados de estrutura atividade para a amida	50

Índice de esquemas

Esquema 5.1 - Método de preparação de aciltioureas partindo de acilisotiocianato	23
Esquema 5.2- Método de preparação de acilisotiocianato	23
Esquema 5.3- Método de preparação de tioureas partindo de Isotiocianato	24
Esquema 5.4 - Método de preparação de tioureas.....	24
Esquema 6.1 - Mecanismo geral para a síntese das aciltioureas pela reação entre benzoílisotiocianato e diferentes aminas.....	35
Esquema 6.2- Mecanismo geral para a síntese das aciltioureas por preparação <i>in situ</i> do acilisotiocianato	37
Esquema 6.3 - Esquema reacional geral da síntese de tioureas	39
Esquema 6.4 - Esquema geral para a preparação do isotiocianato <i>in situ</i> para o composto 16	40
Esquema 6.5 - Grupos substituintes e sua atividade biológica.....	49

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Etapas de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos	3
1.2	Antibacterianos	4
1.3	Antibacterianos – Descoberta e evolução	5
1.4	Resistência bacteriana	6
1.5	Mecanismo de ação e alvo.....	7
2	Tioureias.....	10
2.1	Aplicação das tioureias	11
2.2	Propriedades biológicas das tioureias	12
2.3	Reatividade	17
3	Atividade biológica.....	19
4	Objetivo	20
5	Parte experimental.....	21
5.1	Considerações gerais.....	21
5.2	Procedimento experimental.....	23
5.2.1	Aciltioureias.....	23
5.2.1.1	Procedimento geral partindo de benzoílisotiocianato	23
5.2.1.2	Procedimento geral com preparação de acilisotiocianato <i>in situ</i>	23
5.2.2	Tioureias	24
5.2.2.1	Procedimento geral partindo de isotiocianato	24
5.2.2.2	Procedimento geral com preparação de isotiocianato <i>in situ</i>	24
5.3	Descrição experimental e caracterização.....	25
6	Discussão de resultados.....	35
6.1	Preâmbulo.....	35
6.2	Síntese de aciltioureias	35
6.2.1	Amidas.....	38
6.3	Síntese de tioureias	39
6.4	Caraterização espectral	41
6.4.1	Caraterização espectral composto 13.....	42
6.5	Ensaio biológicos	47
7	Conclusão.....	54
8	Bibliografia.....	55

Abreviaturas:

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
cc	Cromatografia em coluna
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DCM	Diclorometano
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
dec.	Ponto de degradação
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
<i>E. coli</i>	"Escherichia coli"
FDA	"Food and Drug Administration"
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hz	Hertz
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrómetro de massas
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MeCN	Acetonitrilo
MIC ₅₀	Concentração inibitória mínima a 50%
MeOH	Metanol
m/z	Razão massa/ carga
MHz	Megahertz
NEQ	Nova entidade química
P.f.	Ponto de fusão
ppm	partes por milhão
PeEther	Éter de petróleo
QSAR	Relação quantitativa estrutura-atividade
SAR	Relação estrutura-atividade
RNA	Ácido ribonucleico
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de próton
<i>S. aureus</i>	"Staphylococcus aureus"
TB	Tuberculose
TLC	Cromatografia em camada fina
δ	Desvio químico
λ	Comprimento de onda
ν _{máx}	Frequência máxima

1 INTRODUÇÃO

A medicina é das áreas do conhecimento humano ligada à prevenção e ao cuidado permanente da saúde humana. Dentro deste grande conceito engloba-se a prática e conhecimento que visam a cura de doenças, estabelecendo também a prevenção das mesmas.

Desde sempre, a história da saúde e da doença esteve relacionada pois, o ser humano sempre tentou ter uma explicação para os fenômenos que aconteciam e uma solução para os seus males.

Até à era de "Paracelso" (século XVIII) os medicamentos eram extratos de plantas, tecidos animais e substâncias minerais de composição indefinida e só a partir daí é que se começaram a identificar e isolar substâncias orgânicas com ação terapêutica. O primeiro alcalóide denominado por narcotina foi isolado no século XIX pelo farmacêutico Derosne e posteriormente Sertuner isolou a morfina[1]. Daí em diante foram descobertos muitos mais alcalóides, que se tornaram na realidade os verdadeiros princípios ativos das plantas medicinais (figura 1). Nos finais do século XIX, já se usavam em medicina mais de duzentos destes compostos[2].

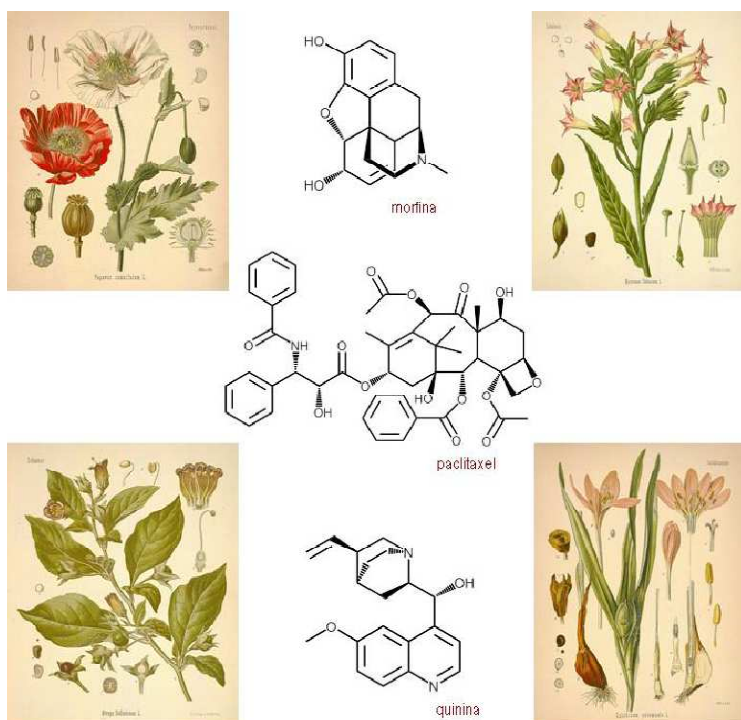


Figura 1.1 – Alcalóides: morfina, paclitaxel e quinina

Foi a partir do final dos anos 30 do século passado e anos seguintes que se deu a revolução dos medicamentos com composição bem definida e teve lugar a descoberta de substâncias importantes como as sulfamidas e mais tarde a penicilina com aplicação em doenças infecciosas nos anos 20 e 30. (ver figura 1.2)[3].

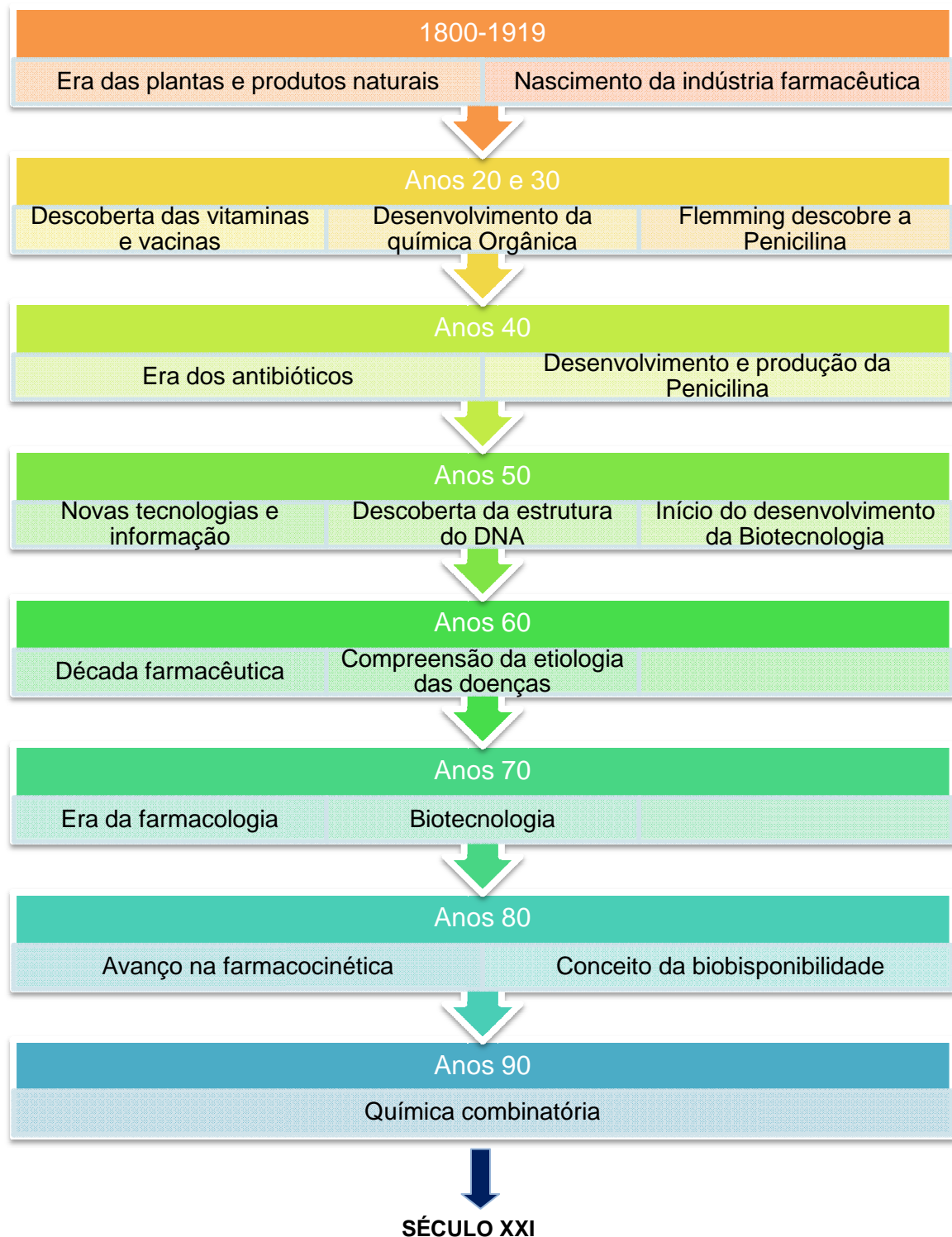


Figura 1.2 – Cronologia do processo de descoberta de fármacos

Posteriormente, com o desenvolvimento da química de síntese, a separação, purificação e a identificação de componentes ativos de preparações foi possível a síntese de novos fármacos. Também com o avanço da farmacologia em conjunto com o desenvolvimento de novos métodos experimentais, foi possível determinar ou avaliar o seu efeito de fármacos no organismo humano[4].

A definição atualmente aceite de medicamento é “toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas” (Decreto-Lei nº176/2006 de 30 Agosto; Artigo 3º).

1.1 Etapas de Descoberta e Desenvolvimento de novos fármacos

A química medicinal tem um papel fundamental no processo de investigação e desenvolvimento de novos fármacos pois, é uma área que envolve as ciências farmacêuticas, biológicas e médicas e tem como finalidade a identificação, o desenho, o desenvolvimento, a síntese de compostos químicos com actividade farmacológica e estudos quantitativos de relação estrutura-atividade.

Hoje em dia, contrariamente ao que acontecia há uns anos atrás é possível utilizar técnicas mais avançadas e que nos permitem uma triagem muito mais rápida da identificação do alvo e da sua afinidade com o receptor com base no *High Throughput Screening* (HTS) que conjuntamente com a química combinatória permite a obtenção de uma maior quantidade de dados e consequentemente uma maior identificação de compostos activos, *hits*. Após a escolha do potencial alvo, este é validado com base em técnicas de *screening virtual* de acordo com a sua afinidade[5]. Uma vez descoberto o composto líder, este é depois optimizado em conjunto com diversas áreas científicas (química orgânica, farmacologia, química medicinal, farmacêutica, etc.) sendo então seleccionado como nova entidade química (NEQ).

Daí que o desenvolvimento de um novo fármaco obedece a um processo de investigação bastante moroso e rigoroso até que reúna os requisitos exigidos de eficácia, segurança e qualidade exigidos para a sua comercialização e administração no ser humano podendo ser estruturado nas seguintes fases (figura 3)[6].



Figura 1.3 - Etapas correspondentes ao desenvolvimento de novos fármacos

A primeira etapa ou descoberta consiste na identificação de um potencial alvo terapêutico. São então isolados e purificados novos compostos derivados de fontes naturais ou sintéticas por via de síntese básica ou síntese por medida e são realizados testes *in-vitro* e *in-vivo* para avaliação das propriedades biológicas das moléculas obtidas no alvo.

Na etapa pré-clínica, o composto seleccionado é testado *in vivo* e procede-se à formulação do medicamento para a sua utilização em testes de estabilidade, estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), toxicologia e utilização em provas clínicas. Estes testes englobam as actividades requeridas pelas entidades competentes para comprovação da eficácia e segurança previamente à introdução no mercado de novos medicamentos[7].

Previamente aos testes clínicos em humanos, têm de ser demonstrados os resultados obtidos nas etapas anteriores e requerida a autorização às entidades competentes para a realização dos ensaios com o novo medicamento (IND- “Investigational New Drug”). Esta etapa é composta essencialmente por 4 fases:

Fase 1 – Obtenção do perfil farmacocinético e farmacodinâmico do fármaco;

Fase 2 – Verificação da eficácia do novo fármaco em voluntários portadores da doença;

Fase 3 – Confirmação da eficácia e segurança do novo medicamento bem como dos efeitos adversos numa população inter-racial;

Fase 4 – Comercialização do medicamento e monitorização dos riscos e benefícios a longo prazo e comparação do perfil do medicamento com outros já existentes no mercado[8].

1.2 Antibacterianos

Desde os primórdios que os humanos se deparam com doenças desconhecidas e incuráveis, sendo que os microrganismos estão desde então associados a estas. As causas destas doenças começaram a ser descobertas a partir do século XIX com o trabalho de Pasteur e Koch, em que foram sendo identificadas várias moléculas com atividade terapêutica por métodos laboratoriais. Mais tarde, surgiu assim o conceito de antibiótico, que é uma substância

química, natural ou sintética que possui a capacidade de inibir o crescimento bacteriano e a sua eliminação, sem efeitos tóxicos para o homem ou animal possibilitando assim que os antibacterianos fossem desenvolvidos para tratar estas infecções[9].

As infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos são as que estão atualmente entre as mais mortíferas, levando a estados clínicos muito graves e a infecções não tratáveis. Assim, consciente dos desafios que se impõem atualmente surge a necessidade de investigação e desenvolvimento de novos antibacterianos, para o tratamento destas infecções[10].

1.3 Antibacterianos – Descoberta e Evolução

Retrocedendo ao século XX, foi o cientista Ehrlich que descobriu os primeiros agentes na área da quimioterapia e desenvolveu o conceito de toxicidade seletiva (atividade seletiva para microrganismos mas, não para células humanas). Mais tarde, Dogmak, descobriu a primeira substância com atividade bacteriana no tratamento infeccioso por *Streptococcus*, asulfamida, e a descoberta acidental do primeiro composto natural com atividade antibacteriana foi descoberta em 1963 quando *Alexander Flemming* estudava culturas de *Staphilococcus aureus* (*S. aureus*) e, que por mero acaso foram contaminadas com fungos da espécie *Penicillium notatum* observando que próximo destes não existia crescimento bacteriano. Formou-se assim uma substância que exercia atividade antibacteriana a qual foi denominada de Penicilina (figura 4)[11].

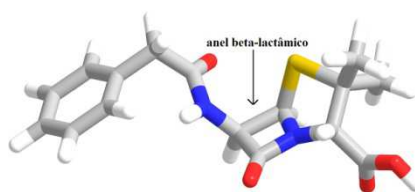


Figura 1.4 – Estrutura da Penicilina

Após a Segunda Guerra Mundial, o uso extensivo da penicilina desencadeou o aparecimento das primeiras bactérias gram-positivas resistentes à penicilina (*Streptococcus pneumoniae*) e, aos poucos as bactérias foram desenvolvendo a multi-resistência a vários análogos como por exemplo a metilicina, tetraciclina, cefalosporina e eritromicina.

Anos mais tarde, surgiu como alternativa para o tratamento de infecções bacterianas, a vancomicina, que demonstrou ser eficaz para o *S. aureus* resistente a metilicina. Contudo, em meados da década de 80, surgiram os primeiros casos de resistência a vancomicina, o que levou a uma nova procura de agentes antibacterianos e, foi aí que se descobriram as oxazolidinonas cujo espectro de ação envolve as bactérias gram-positivas, gram-negativas e microrganismos anaeróbios. Mas, dado que ainda existiam várias lacunas no final dos anos 90

pesquisas desenvolvidas por vários laboratórios descobriram assim uma nova geração de quinolonas denominadas fluoroquinolonas que ampliaram ainda mais o espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e micobactérias exercendo, predominantemente, um efeito bacteriostático[12].

Devido aos diferentes mecanismos de patogenicidade bacteriana, uma infecção pode ser tratada por diferentes antibacterianos, daí que, o aumento alarmante da resistência bacteriana aos antibióticos é sem dúvida, um dos maiores problemas atuais de saúde pública dado que estes compostos constituem uma das principais ferramentas para controlar e tratar as infecções bacterianas, na medicina.

1.4 Resistência bacteriana

Define-se como resistência bacteriana o aparecimento de estirpes bacterianas capazes de resistir aos antibióticos de tratamento atual. Já em 2001, a Organização Mundial da Saúde (OMS) falava da resistência aos antimicrobianos como sendo um problema complexo que exigia medidas e respostas de vários sectores[13]. Ainda assim estes alertas não produziram os efeitos desejados e atualmente continua a ser uma questão de urgente resolução pois, apesar da indústria farmacêutica ter modificado a estrutura química das moléculas de antibióticos já conhecidos e de ter desenvolvido novos antibióticos de forma a poder colmatar a resistência adquirida pelas bactérias, estas novas moléculas só foram eficazes durante uns anos. Mas, de forma a combater esta tendência mais recentemente foram efetuados estudos que demonstram que esta resistência bacteriana pode evoluir através de 3 mecanismos principais, sendo eles:

- Alteração nas proteínas do alvo
- Inativação do fármaco por degradação enzimática
- Alteração da permeabilidade membrana

Em que, a modificação do alvo ou a inativação do fármaco implicaria o desenvolvimento de novas classes de compostos com novos mecanismos de ação[14].

1.5 Mecanismo de ação e alvo

Os processos pelos quais os compostos com atividade antibacteriana inibem o crescimento ou causam a morte das bactérias são muito variáveis sendo por isso classificados segundo o seu mecanismo de ação. Daí que, os parâmetros físico-químicos são muitas vezes utilizados para prever os processos de ADME e toxicidade de um fármaco durante o seu desenvolvimento pois, as moléculas têm de ultrapassar membranas para chegar ao sítio-alvo e provocar o efeito biológico, ou seja, a interação entre o fármaco e os componentes celulares.

Alguns dos componentes celulares que podem afectar a distribuição do fármaco são (figura 5)[15]:

- Parede ou membrana celular
- Ribossomas
- Ácidos nucleicos

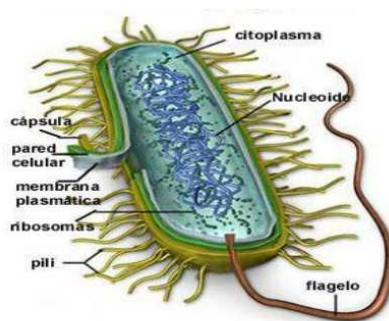


Figura 1.5 – Estrutura celular de uma bactéria[16]

Os que exercem a sua ação antibacteriana na membrana plasmática ou parede celular bacteriana, impedindo a sua reprodução e conseqüentemente a lise da parede celular são denominados de bactericidas, enquanto os que inibem o crescimento não destruindo o microrganismo são denominados de bacteriostáticos.

Daí existirem vários e diferentes mecanismos no combate à multiplicação e crescimento destes microrganismos de entre os quais temos (figura 6)[17]:

- Inibição da síntese da parede celular (ex.: beta-lactâmicos, vancomicina)
- Alteração da membrana citoplasmática (ex.: daptomicina)
- Inibição da síntese proteica (ex.: eritromicinas, tetraciclinas)
- Inibição da síntese dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) (ex.: quinolonas)

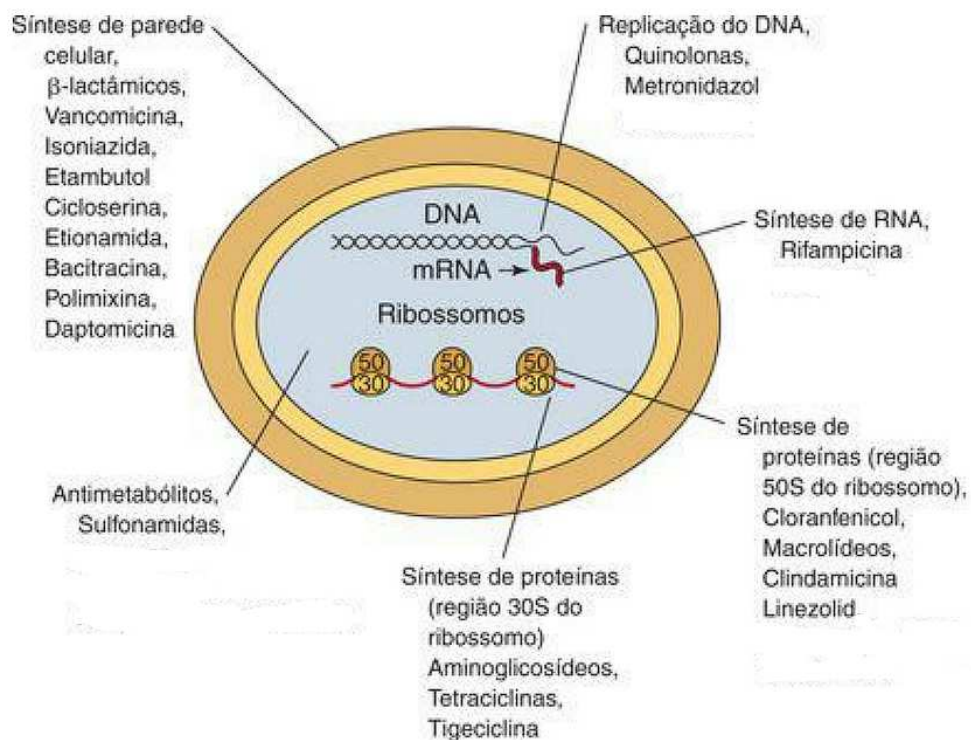


Figura 1.6 – Classes de compostos antibacterianos e seu modo de ação nas bactérias (adaptado de [12])

Quando a ação antimicrobiana incidir sobre a parede celular esta, vai variar de acordo com o tipo de bactéria originando diferenças de permeabilidade nos compostos, influenciando directamente a ação do antibacteriano. Temos por exemplo o caso de bactérias gram-positivas e gram-negativas (figura 7)[18]:

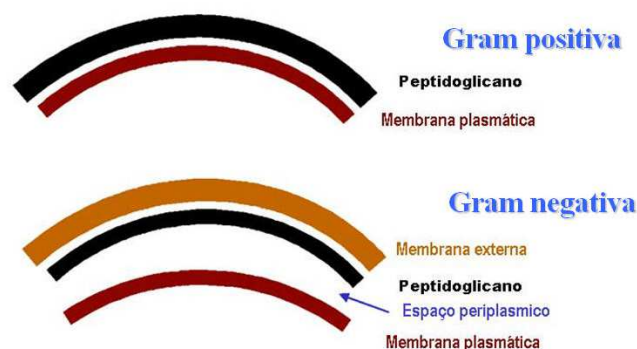


Figura 1.7 - Diferenças estruturais entre bactérias gram-positivas e gram-negativas

Para o caso de bactérias gram-negativas verifica-se que a parede celular revestida por peptidoglicano é muito menor quando comparada com a da bactéria gram-positiva mas, mais

complexa devido à camada externa adicional que dificulta a permeabilidade de fármacos com baixa lipossolubilidade[19].

Daí que, apesar de se ter investido bastante na investigação e desenvolvimento de novos fármacos, o número de novas entidades moleculares não tem aumentado pois, a introdução de novos medicamentos no mercado aprovados pela FDA é um processo que requer testes muito rigorosos a nível da segurança e eficácia para os novos compostos e poucos são os que conseguem cumprir com os requisitos exigidos.

Diante desta perspetiva, a procura de novas estruturas com potencial atividade anti-bacteriana é um dos objetivos na indústria farmacêutica e é também o objetivo do presente trabalho abordando a síntese de novos compostos da família das tioureias criando uma pequena biblioteca de compostos, dado que os compostos produzidos através da ureia, tioureia ou dos seus derivados têm tido especial atenção de grupos de investigadores devido ao seu potencial na química medicinal[20].

2 Tioureias

São compostos organossulfurados com a fórmula química CSN_2H_4 (Figura 2.1) e constituem uma importante classe funcional de produtos naturais e compostos farmacêuticos ativos.

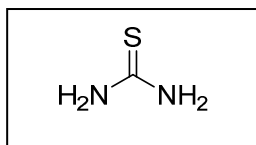


Figura 2.1 – Estrutura química da tiourea

As tioureias foram inicialmente sintetizadas em 1873 por Neuki [21] e são estruturalmente similares às ureias, exceto pela substituição do átomo de oxigênio na ureia por um átomo de enxofre obtendo-se assim compostos que têm tido bastante sucesso na aplicação em muitas doenças infecciosas. Atualmente estão presentes num número significativo de fármacos tais como monastrol, tioperamida, metiamida, burimamida, tiopental e capsazepine (figura 2.2).

Embora, alguns compostos derivados das tioureias sejam conhecidos por serem tóxicos estando diretamente relacionados com a toxicidade pulmonar e a dermatite, geralmente, as tioureias substituídas apresentam toxicidade reduzida.

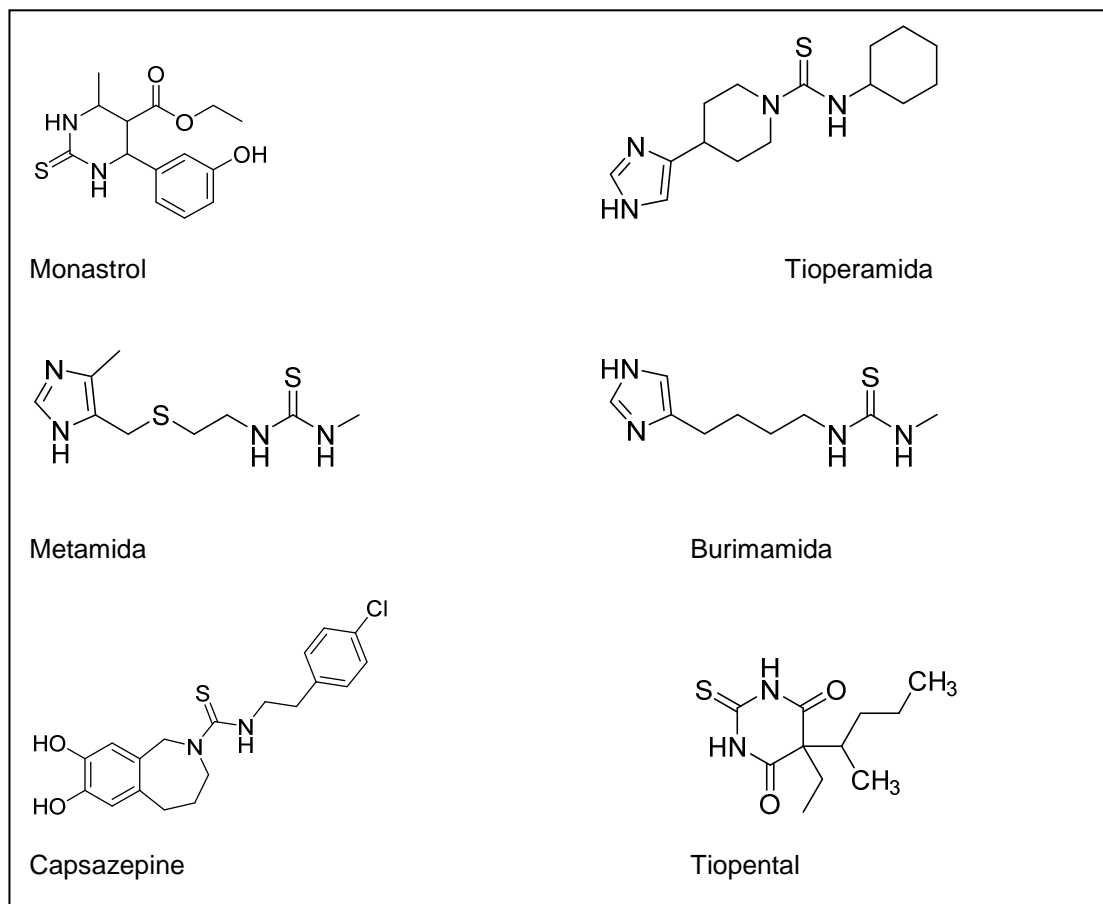


Figura 2.2 – Estruturas do monastrol, tioperamida, metamida, Burimamida, Capsazepine e Tiopental

Nas tioureias, observa-se que os átomos de azoto são capazes de formar ligações de hidrogénio intermoleculares do tipo N-H...S e C-H...O. É também conhecido que a atividade biológica destas substâncias está associada à capacidade de estabelecerem este tipo de ligação.

É um composto único que possui três grupos funcionais diferentes, que são o grupo tiol, amina e imina podendo ocorrer na sua forma tautomérica (figura 2.3)[22].

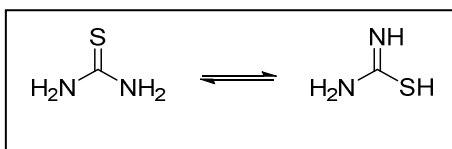


Figura 2.3 – Tautomerismo da tioureia

O método mais comum para a síntese das tioureias é a reacção directa do isotiocianato com amina envolvendo a ataque nucleófilo da amina ao carbono electrofílico do isotiocianato requerendo como solventes como por exemplo a acetona, diclorometano, dimetilformamida e benzeno.

2.1 Aplicação das tioureias

As tioureias podem ser utilizadas para diversos fins, como por exemplo, na indústria agrónoma, as aciltioureias são muito utilizadas pela sua atividade reguladora como fungicida, herbicida, antiviral, etc, na corrosão agindo como inibidores (corrosão do alumínio em HCl); como ligantes em que as tioureias e os seus análogos apresentam dois locais de ligação que lhes permite comportarem-se como ligandos monodentados ou bidentados (ex.: compostos de coordenação na extração de minerais); como fonte de enxofre comum e ainda como auxiliares na protecção contra o fogo nos processos finais na confecção na indústria têxtil[23].

O interesse das tioureias advém do facto de além de serem compostos muito versáteis são também acessíveis através de procedimentos simples. É assim possível a obtenção de moléculas bio-ativas que juntamente com as novas abordagens e ferramentas da química medicinal irá permitir aos cientistas descreverem com maior precisão os modelos QSAR dos compostos, fundamental para se encontrarem diferentes actividades biológicas além da antimicrobiana.

Daí que, o que suscita maior interesse são as suas potencialidades terapêuticas na área da química medicinal de entre as quais se destaca a sua importância biológica na atividade antibacteriana[24], anti-cancerígena[25][26], tratamento de infeções[27], antioxidante[28], e como ligantes[29].

2.2 Propriedades biológicas dos derivados das tioureias

Atividade anti-bacteriana

Reforçando o referido anteriormente, o crescimento da resistência aos antibióticos pode transformar certo tipo de doenças como a pneumonia, tuberculose ou infecções urinárias, em doenças para as quais não existe tratamento, pode também condicionar o transplante de órgãos e até mesmo sessões de quimioterapia. Da existência de vários microrganismos surgem alguns que nos últimos anos sofreram modificações significativas na sensibilidade aos anti-bacterianos, de entre os quais se destacam os estafilococos, os enterococos e os pneumococos. As infecções causadas por *S.aureus* é um dos maiores problemas na história da terapêutica anti-microbiana verificando-se uma diminuição de ação acentuada à maioria dos antibióticos de uso comum como por exemplo as penicilinas, as cefalosporinas e quinolonas. Um exemplo geral de tioureias com actividade contra o *S.aureus*, *E. coli* e *Bacillus subtilis* podem ser derivados de 1-aroil-3-aroil-tioureias (Figura 2.4)[30].

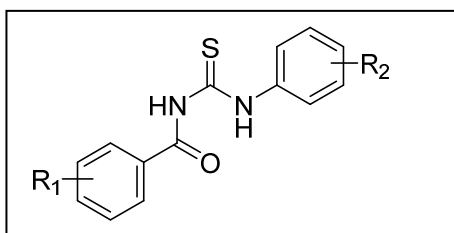


Figura 2.4 – Estrutura geral de 1-aroil-3-aril-tioureias

Actividade anti-cancerígena

O cancro é uma das doenças mais presentes nos últimos anos, porém atualmente é também uma das principais causas de morte a nível mundial, segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde).

Uma das mais importantes aplicações terapêuticas de derivados das tioureias é a sua atividade anti-cancerígena. Moléculas que apresentam o grupo funcional tioureia têm sido utilizadas na terapêutica contra o cancro e também em diagnósticos clínicos. Devido a questões de segurança nomeadamente questões relacionadas com toxicidade e genotoxicidade em células normais causadas pelos fármacos utilizados contra o cancro, a indústria farmacêutica continua em busca de novos e mais seguros tratamentos para este tipo de doença, embora os efeitos secundários continuem a limitar a sua utilização e eficácia. As tioureias, ureias e benzotiazóis são os fármacos mais eficazes para o tratamento do cancro, verificando-se assim que

compostos novos como por exemplo os compostos A - E (figura 2.5, 2.6 e 2.7) foram preparados e rastreados quanto à sua citotoxicidade obtendo-se bons resultados[31].

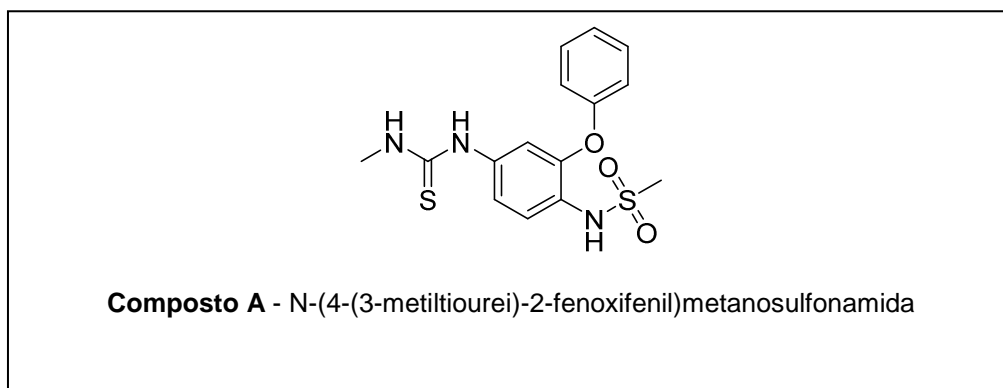


Figura 2.5 - Composto ativo para o tratamento do cancro do pulmão

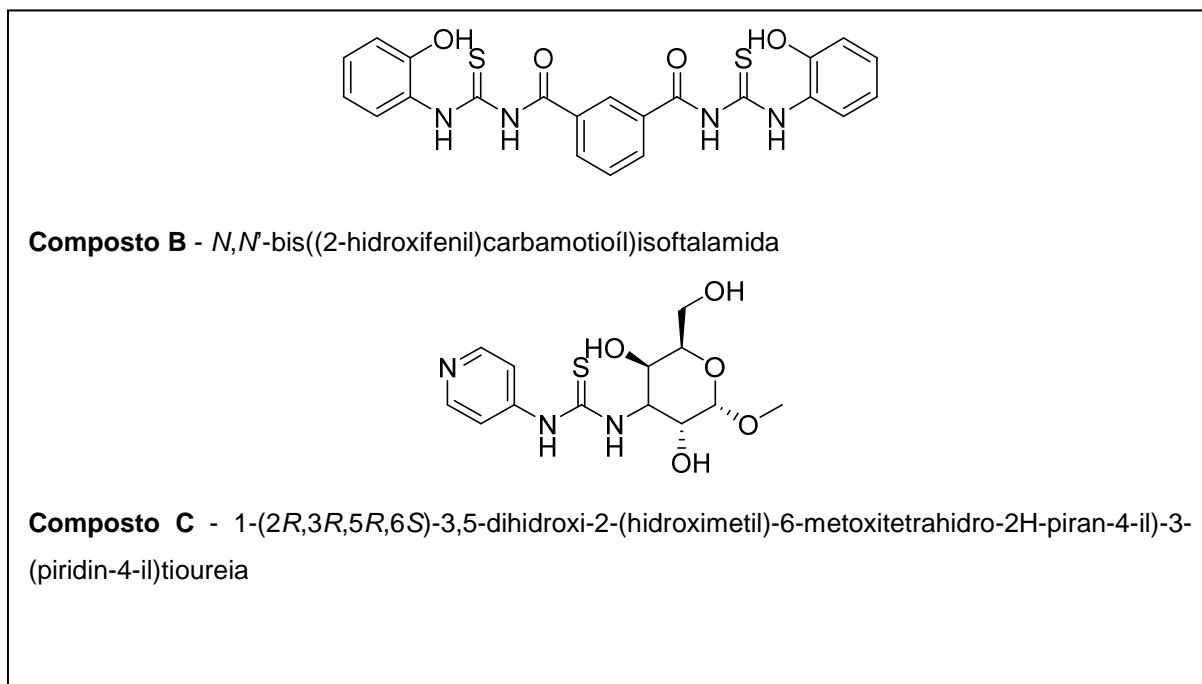
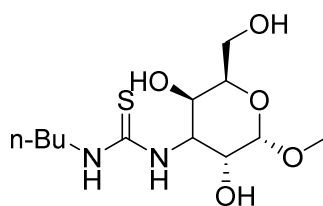
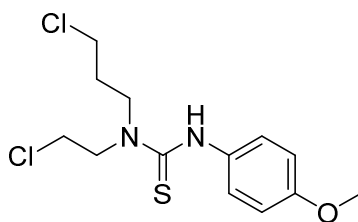


Figura 2.6 - Compostos activos no tratamento das células dos tumores pancreáticos e cerebrais



Composto D - 1-butyl-3-(2R,3R,5R,6S)-3,5-dihidroxi-2-(hidroximetil)-6-metoxitetrahidro-2H-piran-4-il) tiourea



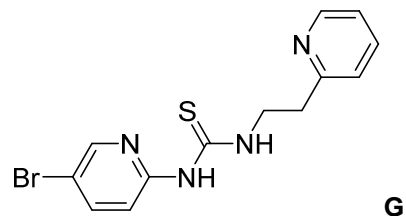
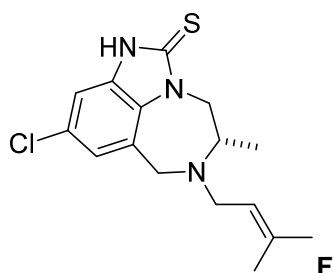
Composto E- 1-(2-cloroetil)-1-(3-cloropropil)-3-(4-metoxifenil)tiourea

Figura 2.7 – Compostos activos no tratamento das células cancerígenas dos tumores cerebrais

Tratamento de infeções

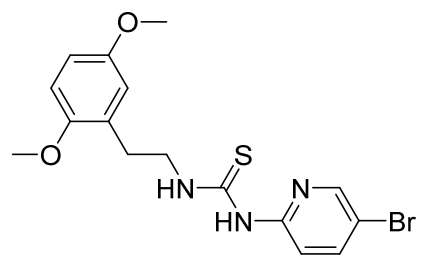
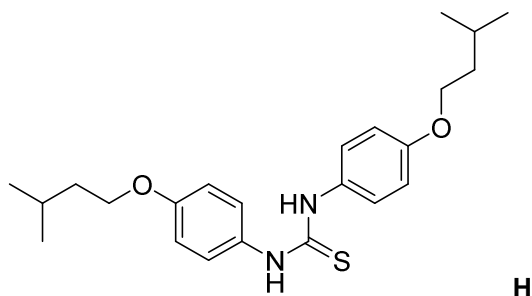
A imunodepressão causada pelo vírus HIV e co-infecção por doenças como a tuberculose conduzem à necessidade de regimes terapêuticos longos e complexos. Para estes casos específicos é necessário desenvolver terapêuticas apropriadas de dupla ação, sendo que aqui também os derivados das tioureias se apresentam como uma classe promissora (figura 2.8)[27]. O composto F e o composto G são assim exemplos usados para o tratamento do HIV. O composto H é usado para o tratamento da tuberculose, enquanto os compostos I, J e K são simultaneamente ativos contra o vírus do HIV tendo também atividade espermicida.

Composto F - (S)-4-cloro-8-metil-7-(3-metilbut-2-en-1-il)-6,7,8,9-tetrahidro-2,7,9a-triazabenzazulen-1(2H)-iona

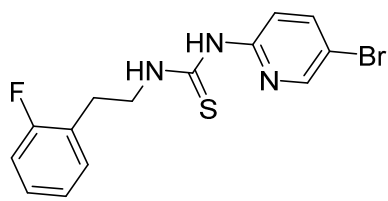


Composto G - 1-(5-bromopiridin-2-il)-3-(2-(piridin-2-il)etil) tioureia

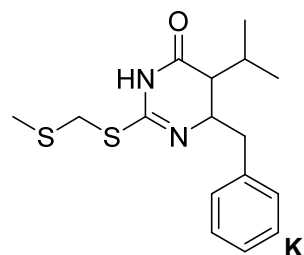
Composto H - 1,3-bis(4-(isopentiloxi)fenil)tioureia



Composto I - 1-(5-bromopiridin-2-il)-3-(2,5-dimetoxifenetil)tioureia



Composto J - 1-(5-bromopiridin-2-il)-3-(2-fluorofenetil)tioureia



Composto K - 6-benzil-5-isopropil-2-(metiltio)metiltio)-5,6-dihidroipirimidin-4(3H)-ona

Figura 2.8 – Derivados de tioureias para o tratamento do HIV e TB

Atividade antioxidante

As tioureias, contendo átomos de enxofre, são susceptíveis de oxidação por um grande número de oxidantes dando origem a vários produtos, incluindo ureias, sulfuretos, óxidos de enxofre, etc. Mas, as vias sintéticas e os produtos finais numa reacção de oxidação vão depender dos reagentes usados e das condições da mistura reaccional[32]. Como exemplo de antioxidantes temos os compostos M – P (figura 2.9)[28].

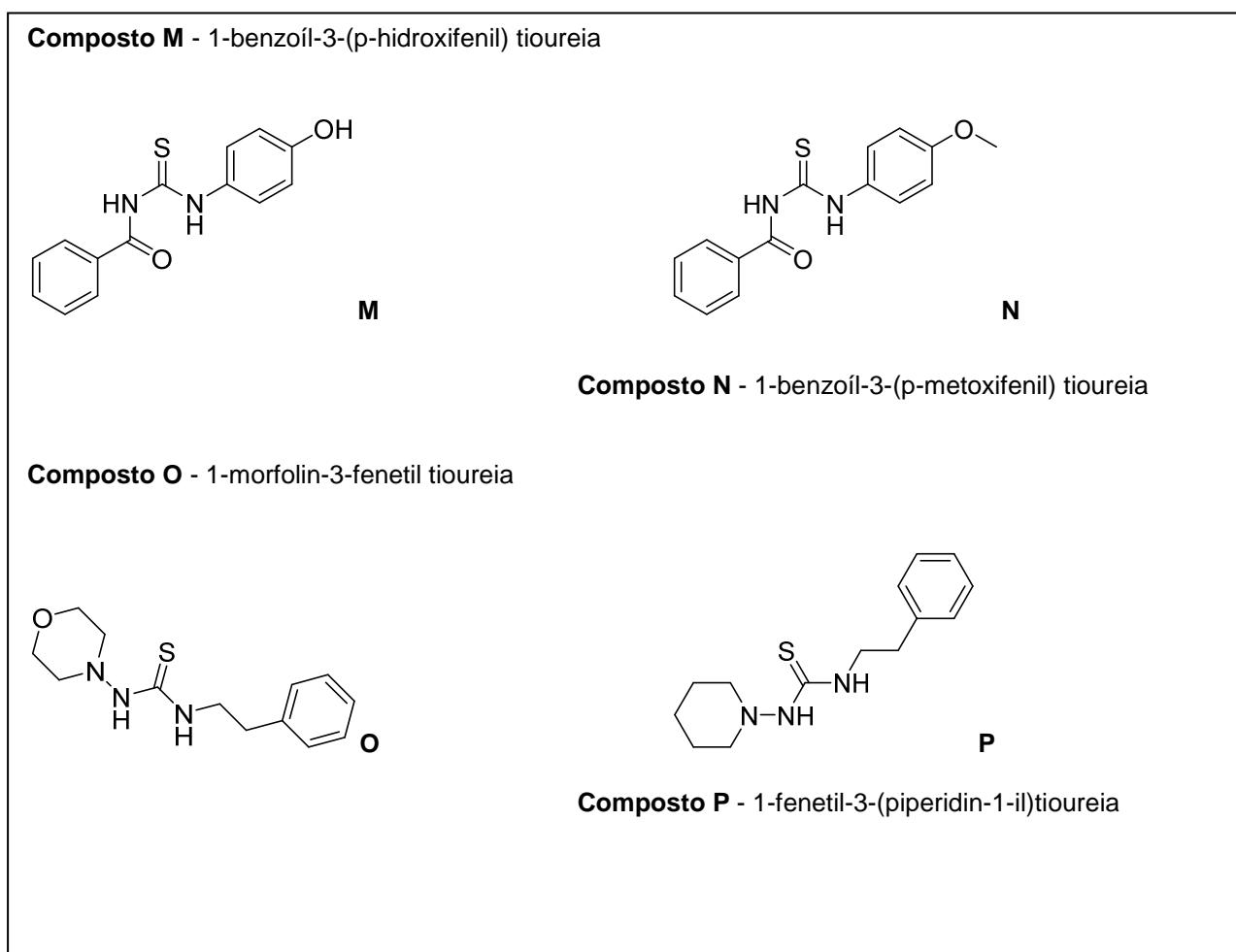


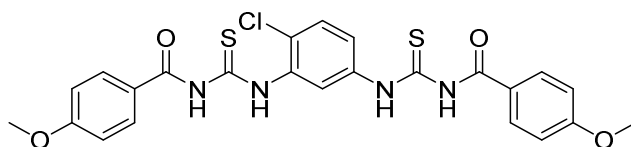
Figura 2.9 – Derivados da tioureia como antioxidantes

Ligandos

As tioureias também têm um grande potencial para agir como ligandos, especialmente na química de coordenação das benzoíl tioureias, formando complexos estáveis de anéis de 6 membros. Estas tioureias têm a capacidade de agir como agentes quelantes devido à presença

dos grupos funcionais C=S e C=O. Podem assim complexar como ligandos neutros ou aniónicos havendo várias possibilidades de ligação dos metais com as tioureias devido à presença de vários átomos dadores de electrões tais como o S, N e O[33].

Como exemplo temos tioureias que apresentam actividade anti-bacteriana contra *S. aureus* – composto Q (figura 2.10).



Composto Q - *N,N'*-((4-cloro-1,3-fenileno)bis(azanediil))bis(carbonotioíl))bis(4-metoxibenzamida)

Figura 2.10 – Derivado da tioureia com actividade bacteriana contra *S.aureus*

2.3 Reatividade

Isotiocianatos

Um dos principais precursores das tioureias são os isotiocianatos, que são compostos com estruturas bastante versáteis pelos seus grupos funcionais e pela sua atividade biológica. Além disso são amplamente aplicados como electrófilos quimiosselektivos devido à sua tolerância em diversas reações.

São uma classe de compostos abundantes em muitos vegetais e têm um papel significativo na actividade preventiva do cancro. Portanto, muitos análogos têm sido sintetizados para aplicações médicas. Podem também ser intermediários na síntese orgânica, especialmente na síntese de compostos heterocíclicos e tioureias assimétricas.

Em síntese orgânica, a presença de um grupo carbonilo nos isotiocianatos revela uma reatividade moderada e única, sendo compostos bastante estáveis em meio aquoso assim como na maioria dos solventes[34]. Os isotiocianatos de acilo (figura 2.11) são compostos bifuncionais, que contêm o grupo C=O e o NC=S. São muito mais reativos do que por exemplo os isotiocianatos de alquilo, isto devido à presença do grupo alquilo e ao facto de este ser um grupo dador de electrões.

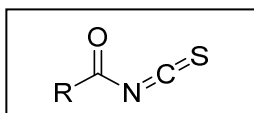


Figura 2.11 – Estrutura geral de isotiocianato de acilo

A sua reatividade é determinada por três centros reativos, que são o átomo de azoto e os átomos de carbono dos grupos C=O e C=S (figura 2.12). Um deles está associado ao seu átomo de azoto com o par de electrões não partilhado, e os outros com o grupo tiocarbonilo e carbonilo. O forte potencial electronegativo do grupo acil aumenta a reactividade funcional do isotiocianato adjacente promovendo a adição nucleofílica no grupo funcional N=C=S.

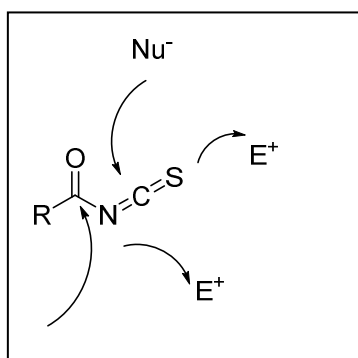


Figura 2.12 – Centros reativos dos isotiocianatos de acilo

O método de seleção dos grupos substituintes permite que diferentes propriedades físico-químicas possam ser relacionadas, e posteriormente se possam desenvolver novos análogos com os dados obtidos.

3 Atividade biológica

Durante o desenvolvimento e investigação de um fármaco, um estudo eficiente de ADME é essencial para aumentar a eficácia, selectividade, uma adequada farmacocinética e toxicológica deste. Para que ocorra esse estudo de absorção, distribuição e a eliminação dos fármacos é necessário que estes atravessem várias membranas celulares, que é determinada pelo balanço ideal entre solubilidade e lipofilicidade.

A lipofilicidade é uma medida da distribuição entre os compostos numa fase orgânica e uma fase aquosa, sendo o resultado expresso como o logaritmo de base 10 das proporções de concentração entre essas fases (coeficiente de partição). É uma das propriedades mais importantes no processo farmacocinético, sendo considerada nos estudos de absorção intestinal, permeabilidade membranar, ligações a proteínas e distribuição em diferentes tecidos[35].

Quanto maior for a lipossolubilidade, maior será a afinidade do fármaco pela fase orgânica e maior será a capacidade do fármaco atravessar as membranas plasmáticas.

A lipofilicidade pode ser manipulada através de modificações na estrutura do composto líder e é considerada um parâmetro crucial na optimização dos parâmetros ADME de uma determinada molécula.

Sendo a absorção de um fármaco um ponto fundamental foram realizados vários estudos, um dos quais por Lipinski (1997) que estabeleceu a regra dos 5 definindo um conjunto de parâmetros que se baseiam em critérios físico-químicos que os fármacos devem apresentar para serem absorvidos pelo organismo humano[36]:

- Peso molecular menor que 500 daltons
- logP menor do que 5
- Máximo de 5 grupos dadores de ligação de hidrogénio
- Máximo de 10 grupos aceitadores da ligação de hidrogénio

A solubilidade é outro dos parâmetros físicos comuns envolvidos na descoberta de novos fármacos. A sua avaliação é uma análise importante uma vez que reflete a biodisponibilidade do composto, limitando ou não a sua absorção a partir do tracto gastrointestinal.

Vários outros estudos foram desenvolvidos para caracterizar outras propriedades importantes, tais como a tensão superficial polar (tPSA), que é a soma das contribuições superficiais dos fragmentos polares de uma molécula e permite prever as propriedades de transporte da molécula através da membrana celular. O seu valor ideal é de 60 Å e indica-nos se o composto passará a barreira hematoencefálica ou se será periférico[37].

4. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo a síntese, caracterização e determinação da estrutura atividade de quinze derivados de tioureias e uma amida. Para a sua caracterização foram utilizados a espectroscopia de IV, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton e carbono (RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente), espectrometria de massa (HPLC-MS) e ponto de fusão.

Para a relação estrutura atividade foi calculada a atividade antimicrobiana pela percentagem de inibição *in-vitro* para dois microorganismos (*E.coli* e *S. aureus*) e foi também realizada a previsão teórica das propriedades físico-químicas, logP, logS e tPSA.

5. Parte Experimental

5.1 Considerações gerais

Ensaio de síntese

Todas as reações foram executadas no Departamento de Química Fina do Labor Qualitas - Tecnimede. A componente experimental deste trabalho envolveu o recurso a procedimentos gerais de laboratório, descritos abaixo:

- Os reagentes e solventes foram adquiridos comercialmente à Merck e à Sigma-Aldrich.
- A evolução de todas as reações aqui descritas foi avaliada por cromatografia em camada fina (TLC) em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) com 0,2 mm de espessura, em suporte de alumínio e a sua revelação foi feita recorrendo a luz ultravioleta (UV) a 254 nm e/ou 312 nm utilizando quando necessário um revelador apropriado para cada situação, solução de permanganato de potássio, solução de Dragendorff e solução de vanilina[38].
- A separação e purificação de todos os produtos sintetizados realizou-se maioritariamente por recristalização com isopropanol. Também foi efetuada cromatografia em coluna (c.c.) utilizando sílica Kieselgel 60 como fase estacionária de granulometria 70 – 230 “mesh” e como eluentes misturas de éter de petróleo e acetato de etilo, e também de diclorometano e acetato de etilo como referido em cada caso.
- A espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN) nomeadamente os espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN foram obtidos no Centro de Química Estrutural, Complexo Interdisciplinar – Instituto Superior Técnico em que o solvente utilizado para a obtenção dos espectros foi o dimetilsulfóxido (DMSO). Os valores dos desvios químicos dos núcleos expressam-se em valores de δ (ppm), tendo em consideração a referência interna do DMSO (2,5 ppm) para os espectros de protão e o sinal intermédio do tripleto do DMSO (39,5 ppm) para os espectros de carbono. Os espectros de ¹H-RMN foram adquiridos a 500 MHz, e os espectros de ¹³C-RMN também a 500 MHz. A descrição dos espectros obedece ao seguinte formato: solvente deuterado; desvio químico de cada sinal (δ , em ppm); intensidade relativa de cada sinal (nH); multiplicidade do sinal (s - singleto, d – duplete, t - tripleto, m - multiplete); constante de acoplamento (*J*, em Hertz); atribuição na molécula, sempre que possível.
- Para a análise por espectrometria de massa, utilizou-se um HPLC-MS acoplado a um detetor seletivo de massas (“Acquity QDA detector da Waters”). Os valores apresentados para cada um dos compostos são expressos em razão massa/carga (*m/z*).

- Os pontos de fusão, não corrigidos, foram medidos num equipamento Buchi M-560 num intervalo de temperatura entre 100 °C e 250 °C com aumento de temperatura de 1 °C/min.
- A identificação por espectroscopia de Infra-vermelho (IV) foi realizada num espectrofotómetro Thermo Unicam Nicolet 380 em suporte de pastilhas KBr. Na descrição são apenas apresentadas as frequências de maior relevância, de maior intensidade ou mais características. Para cada caso, os dados foram indicados pela seguinte ordem: suporte da amostra; frequência máxima de absorção (ν_{\max} em cm^{-1}); tipo de banda: F (forte), m (média), f (fraca); atribuição a um grupo funcional presente no composto sempre que possível.

Ensaio microbiológicos

Para os testes microbiológicos *in vitro* foi determinada a toxicidade de todos os compostos relativos a bactérias gram-positivas (*S.aureus*) e a bactérias gram-negativas (*E. coli*) em que foi utilizado como controlo positivo um antibacteriano de uso clínico (levofloxacina) e como controlo negativo o DMSO nas mesmas condições que os compostos testados. Calculou-se o valor de MIC₅₀ e a sua sensibilidade foi determinada através da medida de inibição de crescimento de acordo com o protocolo associado (em anexo).

Os microrganismos foram incubados a 37 °C durante 5 e 26 horas para o *S. aureus* e *E. coli*, respetivamente, a uma concentração de 100 e 600 µM das tioureias. As soluções stock dos compostos foram preparadas em DMSO, que não teve nenhum efeito nos microrganismos à concentração estudada. Como controlo positivo utilizou-se a levofloxacina nas mesmas concentrações e tempos de exposição. Como controlo negativo utilizaram-se as bactérias sem tratamento. A avaliação do crescimento celular determinada pelo método da microdiluição foi efetuada num espectrofotómetro UV-VIS a 595 nm avaliando a densidade ótica (OD) utilizando placas de 96 poços de acordo com o protocolo em anexo.

A partir destes dados, determinou-se o MIC₅₀, definido-se como sendo a concentração mínima para inibição de 50% do crescimento bacteriano.

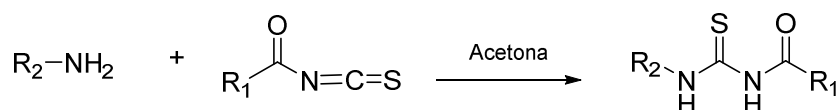
Foram realizados ensaios em duplicado ou triplicado para cada um dos compostos e os resultados obtidos foram considerados como significativos para valores de MIC₅₀ até 200µM.

5.2 Procedimento Experimental

5.2.1 Aciltioureas

5.2.1.1 Procedimento geral partindo de benzoílisotiocianato

O benzoílisotiocianato (1.1 eq.) foi adicionado gota a gota a uma correspondente solução de amina (1 eq.) em acetona anidra (21 mL) com agitação à temperatura ambiente. A reação decorreu até se completar entre 45 minutos a 3 horas (monitorizada por cromatografia em camada fina - TLC). Consoante o produto final este pode ser isolado por filtração, recristalização de isopropanol ou purificação por c.c. e seco em vácuo a 40 °C[39].



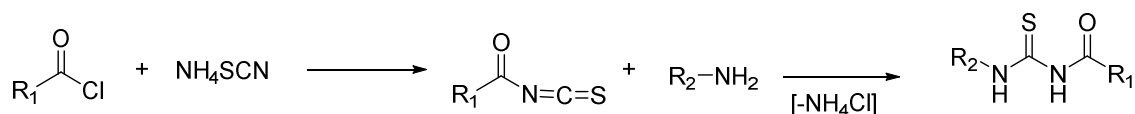
Esquema 5.1: Método de preparação de aciltioureas partindo de acilisotiocianato.

5.2.1.2 Procedimento geral com preparação de acilisotiocianato *in situ*

Uma solução de cloreto de ácido (1 eq.) foi adicionada gota a gota a uma solução de tiocianato de amónia (1.2 eq.) em acetona anidra (20 mL) com agitação à temperatura ambiente. Após a formação do intermediário adicionou-se a correspondente amina (1 eq.) e a mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por um período de 12 – 24 horas.

Finalizada a reação, a purificação do respetivo produto foi efetuada recorrendo a vários procedimentos que envolveram a recristalização, extração e a filtração.

O produto final foi isolado como um sólido e foi seco em vácuo a 40 °C[40].

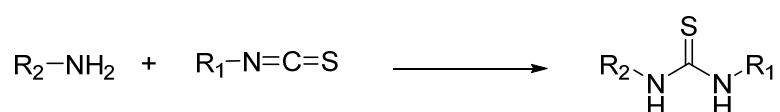


Esquema 5.2: Método de preparação de acilisotiocianato.

5.2.2 Tioureias

5.2.2.1 Procedimento geral a partir de isotiocianato

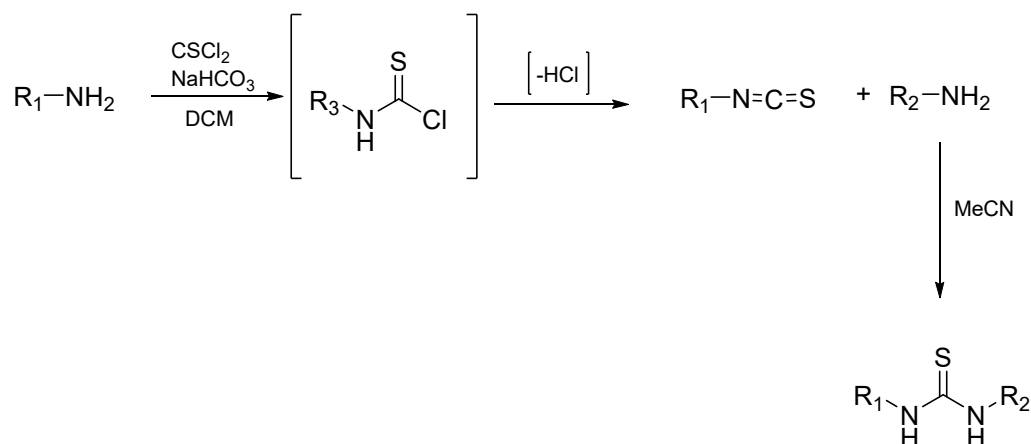
O isotiocianato (1 eq.) foi adicionado a uma correspondente solução de amina (1 eq.) em acetonitrilo anidro ou tolueno (9 mL) com agitação à temperatura ambiente durante 12 - 72 horas até a reação estar completa (monitorizada por TLC). O produto final foi isolado como um sólido e foi seco em vácuo a 40 °C[41].



Esquema 5.3: Método de preparação de tioureias partindo de isotiocianato

5.2.2.2 Procedimento geral com preparação de isotiocianato *in situ*

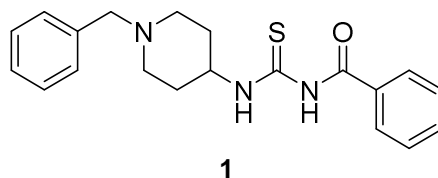
Sobre uma solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio (1 eq.) em água purificada (20 mL) foi adicionado diclorometano (20 mL) e amina (4 eq.). O produto crude obtido foi isolado como um sólido amarelo claro foi seco sob vácuo durante toda a noite e utilizado no passo seguinte da reação sem mais purificação[42]. Após 21 horas, o isotiocianato preparado foi adicionado à temperatura ambiente a uma solução correspondente de amina em acetonitrilo e a reação decorreu durante 24 horas até estar completa (controlada por TLC). O produto obtido foi isolado como um sólido e seco em vácuo a 40 °C.



Esquema 5.4: Método de preparação de tioureias.

5.3 Descrição experimental e caracterização

N-Benzoíl-*N'*-(1-benzil-4-piperidinil) tioureia (1)



Seguindo o procedimento descrito em 5.2.1.1 partiu-se de 4-amino-1-benzilpiperidina (3.2 mmol, 0.30 g) e de benzoílisotiocianato (3.5 mmol, 0.50 mL) obtendo-se um óleo amarelo que foi adsorvido em sílica com evaporação do solvente em vácuo. O resíduo obtido foi purificado posteriormente por c.c. (PeEther:AcOEt, 2:1). As frações com produto foram recolhidas e evaporadas à secura a pressão reduzida. O resíduo obtido foi triturado com uma solução de éter de petróleo e éter dietílico, foi filtrado e seco em estufa de alto-vácuo a 40 °C. O produto foi isolado como um sólido amarelo (0.144 g, 26%); P.f. 112 -114 °C.

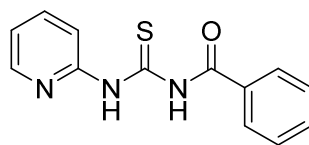
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 1.66-1.67 (NHCHCH, m, 2H), 1.96-2.04 (NHCHCH, m, 2H), 2.16-2.25 (CHCH₂CH, m, 2H), 2.66-2.73 (CHCH₂CH, m, 2H), 3.29 (NCH₂, s, 2H), 4.20-4.29 (NHCH, m, 1H), 7.22-7.36 (CH₂CAr, m, 5H), 7.45-7.55 (CCHCH, m, 2H), 7.61-7.67 (CCHCHCH, m, 1H), 7.93 (COCC, d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 10.95 (CHNHCS, s, 1H), 11.26 (CSNHCO, s, 1H).

¹³C-RMN (500 MHz, DMSO) δ(ppm): 30.7 (NHCHCH), 51.7 (NCH), 62.5 (NCH₂), 127.3 (CH₂CCHCHCH), 128.3 (ArCH), 128.7 (COCCHCH), 132.0 (COCCHCHCH), 132.7 (CO), 138.9 (NCH₂C), 168.8 (CCONH), 179.6 (NHCSNH).

IV (KBr) ν_{máx} (cm⁻¹): 1185 (F, N-CS-N); 1126 (F, C-N); 1539 (F, C=C); 1664 (F, C=O); 2760 (m, C-H); 2932 (m, C-H); 3239 (m, N-H)

ES *m/z* = 354 (M⁺H⁺)

1-Benzoíl-3-piridin-2-il tioureia (2)



2

Seguindo o procedimento descrito em 5.2.1.1 partiu-se de benzoílisotiocianato (3.5 mmol, 0.50 mL) e de 2-aminopiridina (3.2 mmol, 0.30 g) obtendo-se uma solução amarela límpida. O resíduo obtido foi purificado efectuando-se uma recristalização em isopropanol. O produto obtido foi isolado como um sólido amarelo (0.551 g, 67%); P.f. 138 - 142 °C; P.f. (Lit.) 137 °C [43]

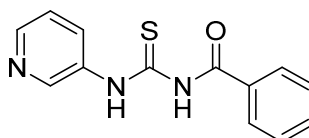
¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 7.26-7.31 (NCHCH, m, 1H), 7.57 (NCCHH, d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.65-7.72 (ArH, m, 3H), 7.90-7.96 (NCCHCH, m, 1H), 7.97-8.02 (COCCH, m, 2H), 8.45 (NCHH, d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 11.70 (CSNHCO, s, 1H), 13.10 (CNHCS, s, 1H).

¹³C-RMN (500 MHz, DMSO) δ(ppm): 129.1 (COCCHCHCH), 133.6 (COC), 178.3 (NHCSNH).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 1157 (F, =C-N), 1250 (F, N-CS-N), 1284 (F, C-N), 1340 (m, N-CS-N), 1438 (F, C=C), 1553 (F, C-N), 1677 (F, C=O), 3086 (m, N-H), 3276 (m, N-H).

ES *m/z* = 258 (M⁺H⁺)

1-Benzoíl-3- piridin-3-il tioureia (3)



3

Seguindo o procedimento descrito em 5.2.1.1 partiu-se de benzoílisotiocianato (3.5 mmol, 0.50 mL) e de 3-aminopiridina (3.2 mmol, 0.30 g) obtendo-se um precipitado amarelo. Levou-se a mistura reacional a 0 °C meia-hora. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida e efetuou-se uma recristalização em isopropanol. O produto obtido foi isolado como um sólido amarelo.

(0.313 g, 38%); P.f. 165–167 °C; P.f. (Lit.) 167 – 168 °C[44]

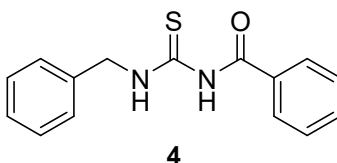
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 7.44-7.51 (NHCCH, m, 1H), 7.52-7.60 (NHCCHCH, m, 1H), 7.64-7.72 (CCHCHCH, m, 1H), 7.97-8.01 (CCHCH, m, 2H), 8.13 (COCCH, d, *J*=8.2 Hz, 2H), 8.44-8.50 (NCHH, m, 1H), 8.76 (NCHC, d, *J*=3.0 Hz, 1H), 11.75 (CSNHCO, s, 1H), 12.50 (CNHCS, s, 1H).

^{13}C -RMN (500 MHz, DMSO) $\delta(\text{ppm})$: 123.9 (NHCCH $\underline{\text{C}}\text{H}$), 128.3 (COC $\underline{\text{C}}\text{H}$) 128.5 (COCCH $\underline{\text{C}}\text{H}$), 132.5 (COC $\underline{\text{C}}$), 135.5 (NH $\underline{\text{C}}$), 147.4 (N $\underline{\text{C}}\text{H}$), 168.6 (C $\underline{\text{C}}$ ONH), 180.9 (NH $\underline{\text{C}}$ SNH).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 1156 (F, =C-N), 1257 (F, N-CS-N), 1284 (F, C-N), 1326 (m, N-CS-N), 1479 (F, C=C), 1545 (F, C-N), 1590 (F, C=C), 1675 (F, C=O), 2992 (m, C-H), 3167 (m, N-H).

ES m/z = 258 (M^+H^+)

1-Benzoíl-3- benzil tioureia (4)



Seguindo o procedimento descrito em 5.2.1.1 partiu-se de benzoílisotiocianato (3.5 mmol, 0.50 mL) e de benzilamina (3.2 mmol, 0.35 mL).

Obteve-se uma suspensão branca, levou-se a 0 °C durante meia-hora e filtrou-se o precipitado que foi lavado com pequenos volumes de acetona fria. O produto foi isolado como um sólido branco (0.624 g, 72%); P.f. 125 – 126 °C; P.f. (Lit.) 123 – 125 °C [45]

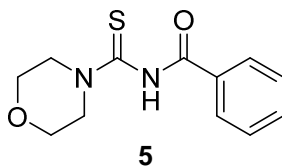
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 4.88 (NHC $\underline{\text{H}}$, d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.27-7.33 (CCHCHC $\underline{\text{H}}$, m, 1H), 7.34-7.43 (NHCH $\underline{2}\text{ArH}$, m, 4H), 7.52 (COCCHC $\underline{\text{H}}$, t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.60-7.68 (COCCHCHC $\underline{\text{H}}$, m, 1H), 7.91-7.95 (COC $\underline{\text{C}}\text{H}$, m, 2H), 11.25 (CH $\underline{2}\text{NHCS}$, s, 1H), 11.45 (CSN $\underline{\text{H}}\text{CO}$, s, 1H)

^{13}C -RMN (500 MHz, DMSO) $\delta(\text{ppm})$: 48.6 (NH $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 127.7 (CH $\underline{2}\text{CCH}$), 128.1 (Ar $\underline{\text{C}}\text{H}$), 128.9 (COCCH $\underline{\text{C}}\text{H}$), 132.7 (COC $\underline{\text{C}}$), 133.6 (COCCHCH $\underline{\text{C}}\text{H}$), 137.8 (NHCH $\underline{2}\text{C}$), 168.5 (C $\underline{\text{C}}$ ONH), 181.0 (NH $\underline{\text{C}}$ SNH).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 1167 (F, N-CS-N), 1253 (F, C-N), 1320 (m, N-CS-N), 1454 (m, C=C), 1540 (F, C-N), 1603 (m, C=C), 1673 (C=O), 3168 (m, =C-H), 3262 (m, N-H).

ES m/z = 271 (M^+H^+)

1-Benzoíl-3-morfolina tioureia (5)



Seguindo o procedimento descrito em 5.2.1.1 partiu-se de benzoílisotiocianato (3.8 mmol, 0.50 mL) e de morfolina (3.4 mmol, 0.30 g).

Obteve-se uma solução amarela límpida e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O resíduo obtido foi triturado com uma solução de éter de petróleo e éter dietílico, foi filtrado e seco em estufa de vácuo a 40 °C. O produto foi isolado como um sólido amarelo (0.588 g, 68%); P.f. 134 – 136 °C; P.f. (Lit.) 131 – 132 °C[46]

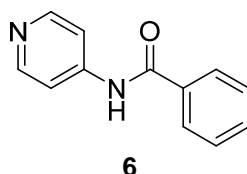
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 3.35-3.73 (CH₂N, m, 4H), 4.12-4.24 (CH₂O, m, 4H), 7.51 (CCHCH, t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.62 (CCHCHCH, t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.95 (COCCH, d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 10.82 (CSNHCO, s, 1H).

¹³C-RMN (500 MHz, DMSO) δ(ppm): 50.8 (NCH₂), 51.4 (NCH), 66.1 (NCH₂CH₂O), 128.7 (COCCHCH), 138.0 (COC), 164.3 (CCONH), 180.3 (NHCSN).

IV (KBr) ν_{máx} (cm⁻¹): 1114 (F, C-O-C), 1200 (F, N-CS-N), 1357 (m, N-CS-N), 1454 (F, C=C), 1525 (F, C-N), 1666 (F, C=O), 2847 (m, C-H), 3241 (m, N-H).

ES *m/z* = 251 (M⁺H⁺)

N-(piridin-4-il) benzamida (6)



Seguindo o procedimento descrito em 5.2.1.1 partiu-se de benzoílisotiocianato (3.5 mmol, 0.50 mL) e de 4-aminopiridina (3.2 mmol, 0.30 g).

Obteve-se uma solução turva branca e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. De seguida efectuou-se uma recristalização em isopropanol. O subproduto obtido foi isolado como um sólido branco (0.150 g, 24%); P.f. 174 – 180 °C; P.f. (Lit.) 202 – 203 °C[47]

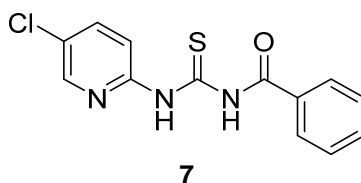
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 7.59-7.66 (NHCCH, m, 2H), 7.70-7.74 (CCHCH, m, 2H), 8.00-8.06 (CHCHCH, m, 1H), 8.27-8.33 (COCCH, m, 2H), 8.74-8.80 (NCH, m, 2H), 11.50 (CONH, s, 1H).

¹³C-RMN (500 MHz, DMSO) δ(ppm): 115.7 (NHCCH), 128.6 (COCCHCH), 133.6 (COC), 143.1 (CONHC), 153.7 (CCHCHN), 167.8 (CCONH).

IV (KBr) ν_{máx} (cm⁻¹): 1190 (F, =C-N), 1243 (F, C-N), 1472 (F, C=C), 1570 (F, C-N), 1695 (F, C=O).

ES *m/z* = 199 (M⁺H⁺)

1-Benzil-3-(5-cloro-piridin-2-il) tioureia (7)



Seguindo o procedimento descrito em 5.2.1.2 partiu-se de 2-amino-5-cloropiridina (10 mmol, 1.30 g) e de cloreto de benzoílo (10 mmol, 1.16 mL). O solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida e o resíduo obtido foi recristalizado de isopropanol obtendo-se um sólido esbranquiçado (0.149 g, 5%); P.f. 144 – 150 °C; P.f. (Lit.) 150 °C[48]

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 7.52-7.60 (NHCCH, m, 1H), 7.64-7.72 (CCHCH, m, 2H), 7.95-8.00 (CCHCHCH, m, 1H), 8.01-8.09 (COCCH, m, 2H), 8.51 (NCHClCH, d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.79 (NHCNCH, s, 1H), 11.81 (CSNHCO, s, 1H), 13.32 (CNHCS, s, 1H).

¹³C-RMN (500 MHz, DMSO) δ(ppm): 115.6 (NHCCH), 123.2 (NCHCCl), 128.9 (COCCH, COCCHCH), 132.0 (COCCHCHCH), 134.9 (COC), 138.8 (NHCCHCH), 150.9 (CNCH), 181.0 (NHCSNH).

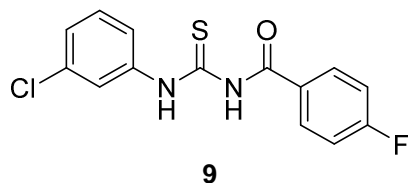
IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 825 (F, C-Cl), 1151 (F, =C-N), 1244 (F, C-N), 1331 (F, N-CS-N), 1455 (m, C=C), 1514 (F, C-N), 1674 (F, C=O), 3054 (m, =C-H), 3420 (m, N-H).

ES *m/z* = 292 (M⁺H⁺)

Composto 8

Seguindo o procedimento descrito em 5.2.1.2 partiu-se da correspondente amina (1 eq.) e do correspondente cloreto de ácido (1 eq.) e obteve-se um precipitado amarelo que foi filtrado e lavado com pequenos volumes de acetona fria. O produto final foi isolado como um sólido amarelo (0.612 g, 18%); dec. 186 – 190 °C

3-(3-clorofenil)-1-(4-fluorbenzoil) tioureia (9)



Seguindo o procedimento descrito em 5.2.1.2 partiu-se de 3-cloroanilina (10 mmol, 1.05 mL) e de cloreto do 4-fluorbenzoil (10 mmol, 1.18 mL). Obteve-se um precipitado e, este foi filtrado e lavado com pequenos volumes de acetona fria. O produto final foi isolado como um sólido amarelo (0.660 g; 24%); dec. 190 – 205 °C

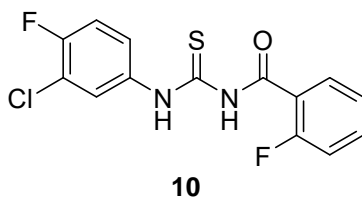
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 7.31-7.42 (NHCCH, NHCCHCH, m, 2H), 7.45 (CCICH, t, *J*=8.3 Hz, 1H), 7.54-7.60 (FCHH, m, 2H), 7.94 (NHCCH, s, 1H), 8.04-8.11 (COCCH, m, 2H), 11.73 (CCONH, s, 1H), 12.55 (CNHCS, s, 1H).

¹³C-RMN (500 MHz, DMSO) δ(ppm): 115.9 (CFCH), 123.5 (NHCCH), 124.8 (NHCCHCl), 126.5 (CCICHCH), 129.1 (COCCH) 131.2 (NHCCHCH), 133.2 (CCl), 139.9 (COC), 164.4 (NHC), 166.5 (CCONH), 167.5 (CF), 179.9 (NHCSNH).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 817 (F, C-Cl), 1078 (F, =C-N), 1201 (m, N-CS-N), 1279 (m, C-N), 1309 (m, N-CS-N), 1357 (m, C-F), 1497 (F, C=C), 1505 (m, C-N), 1671 (F, C=O), 3413 (m, N-H).

ES m/z = 251 (M⁺H⁺)

3-(3-cloro-4-fluorofenil)-1-(2-fluorbenzoil) tioureia (10)



Seguindo o procedimento descrito em 5.2.1.2 partiu-se de 3-cloro-4-fluoranolina (10 mmol, 1.46 g) e de cloreto de 2-fluorbenzoil (10 mmol, 1.10 mL).

Procedeu-se à extracção com EtOAc (2x100 mL) e à secagem da fase orgânica resultante com Na₂SO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. O produto obtido foi isolado como um sólido amarelo escuro. (1.018 g; 31%); dec. 191 – 206 °C

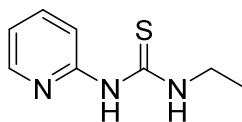
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 7.32-7.39 (COCCFCH₂, COCCHCH₂, m, 2H), 7.44-7.52 (NHCC₂H₅, NHCCHCH₂, m, 2H), 7.57-7.74 (COCCHCHCH₂, NHCC₂H₅, m, 2H), 7.96-8.01 (COCC₂H₅) (m, 1H), 11.85 (CCONH₂) (s, 1H), 12.23 (CNHCS) (s, 1H).

¹³C-RMN (500 MHz, DMSO) δ(ppm): 116.6 (NHCCH₂) 116.8 (COCCFCH₂), 117.2 (CHCCICF), 119.6 (COCCCH₂), 125.0 (COCCH₂) 126.6 (NHCCH₂), 128.8 (COCCHCH₂), 134.6 (COCCFCHCH₂), 136.6 (NHCC₂), 154.8 (NHCCHCH₂F), 158.8 (COCCH₂F), 165.7 (CCO), 179.9 (NHCCSNH).

IV (KBr) ν_{máx} (cm⁻¹): 833(F, C-Cl), 1109 (m, =C-N), 1203 (m, N-CS-N), 1240 (F, C-N), 1319 (m, N-CS-N), 1352 (m, C-F), 1374 (m, C-F), 1472 (m, C=C), 1521 (F, C-N), 1604 (F, C=C), 1701 (F, C=O), 3019 (m, =C-H), 3200 (m, N-H).

ES m/z = 251 (M⁺H⁺)

N-etil-3-(piridin-2-il) tiourea (11)



11

Seguindo o procedimento descrito em 5.2.2.1 partiu-se de 2-aminopiridina (3.2 mmol, 0.30 g) e de etilisotiocianato (3.2 mmol, 0.30 mL) em tolueno.

Obteve-se uma suspensão branca, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e efetuou-se uma recristalização em isopropanol. O produto obtido foi isolado como um sólido branco foi filtrado e seco em estufa de vácuo a 40 °C. (0.180 g, 19%); P.f. 123 – 124 °C; P.f. (Lit.) 122 – 123 °C[49]

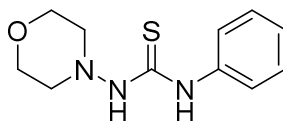
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 1.20 (CH₂CH₃, t, *J* = 7.3Hz, 3H), 3.58-3.65 (CH₃CH₂, m, 2H), 6.99-7.06 (NCHCH₂, m, 1H), 7.15 (NHCC₂H₅, d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.76 (CCHCH₂, t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.22 (CNCH₂, s, 1H), 10.52 (CH₂NH₂, s, 1H), 11.63 (CSNH₂, s, 1H).

¹³C-RMN (500 MHz, DMSO) δ(ppm): 14.6 (CH₃CH₂), 113.0 (NHCCH₂), 118.2 (CNCHCH₂), 139.4 (NHCCHCH₂), 146.1 (NHCNCH₂), 154.3 (NHCCN), 179.7 (NHCCSNH).

IV (KBr) ν_{máx} (cm⁻¹): 1205 (F, N-CS-N), 1261 (m, C-N), 1316 (m, N-CS-N), 1476 (F, C=C), 1564 (F, C-N), 1603 (F, C=C), 2970 (m, C-H), 3033 (m, =C-H), 3219 (m, N-H).

ES m/z = 182 (M⁺H⁺)

1-Fenil-3-(morfolina-4-il) tioureia (12)



12

Seguindo o procedimento descrito em 5.2.2.1 partiu-se de fenilisotiocianato (2.9 mmol, 0.40 mL) e de uma solução de 4-aminomorfolina (2.9 mmol, 0.30 mL) em acetonitrilo. Obteve-se uma solução límpida incolor, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e efetuou-se uma recristalização em isopropanol. O produto obtido foi isolado como um sólido branco. (0.551 g, 79%); P.f. 163 – 164 °C; P.f. (Lit.) 165 – 167 °C[50]

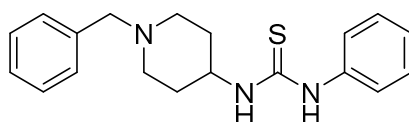
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 2.70-2.90 (NCH₂, m, 4H), 3.60-3.83 (OCH₂, m, 4H), 7.11-7.19 (CCHCHCH, m, 1H), 7.29-7.37 (NHCCHCH, m, 2H), 7.59 (NHCC_H, d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 9.31 (NNHCS, s, 1H), 9.71 (CSNH_C, s, 1H).

¹³C-RMN (500 MHz, DMSO) δ(ppm): 54.3 (NHNCH₂), 66.1 (NHNCH₂CH₂), 125.5 (NHCCHCHCH), 128.3 (NHCCHCH), 139.4 (NHCAr), 177.9 (NHCSNH).

IV (KBr) ν_{máx} (cm⁻¹): 1106 (F, C-O-C), 1198 (F, N-CS-N), 1259 (F, C-N), 1498 (F, C=C), 1528 (m, C-N), 1591 (m, C=C), 2843 (m, C-H), 3258 (m, =C-H), 3296 (m, N-H).

ES *m/z* = 238 (M⁺H⁺)

3-(1-benzilpiperidin-4-il)-1-fenil tioureia (13)



13

Seguindo o procedimento descrito em 5.2.2.1 partiu-se de fenilisotiocianato (1.6 mmol, 0.20 mL) e de 4-amino-1-benzilpiperidina (1.6 mmol, 0.30 mL) em acetonitrilo.

Obteve-se uma solução límpida incolor, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e efetuou-se uma recristalização em isopropanol. O produto obtido foi isolado como um sólido branco foi filtrado e seco em estufa de vácuo a 40 °C. (0.400 g, 78%); P.f. 157 °C

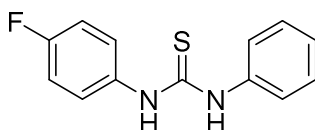
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 1.49-1.90 (NHCHCH, m, 4H), 2.05-2.75 (CHCH₂CH, m, 4H), 3.46 (NCH₂C, s, 2H), 4.26 (CSNHCH, s, 1H), 7.21-7.37 (CH₂CAr, m, 8H), 7.45 (CHNHCS, d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.64-7.70 (NHCC_H, m, 2H), 9.39 (CNHCS, s, 1H).

^{13}C -RMN 500 MHz, DMSO) $\delta(\text{ppm})$: 31.6 (NHCHCH), 51.1 (NHCH), 52.3 (NHCHCH₂CH₂), 62.6 (NCH₂), 123.1 (NHCCH), 125.3 (CH₂CCH), 128.3 (CH₂CCHCH), 129.2 (CH₂CCHCHCH), 139.0 (CH₂C), 140.0 (NHCAr), 179.9 (NHCSNH).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 1251 (m, C-N), 1452 (F, C=C), 1494 (F, C-N), 1557 (F, C=C), 2815 (m, C-H), 3043 (m, =C-H), 3205 (m, N-H).

ES m/z = 326 (M^+H^+)

1-(4-fluorofenil)-3-fenil tioureia (14)



14

Seguindo o procedimento descrito em 5.2.2.1 partiu-se de fenilisotiocianato (2.7 mmol, 0.33 mL) e de 4-fluoroanilina (2.7 mmol, 0.26 mL) em acetonitrilo.

Obteve-se uma suspensão branca, levou-se a 0 °C durante 0.5 hora e filtrou-se o precipitado em alto vácuo sendo posteriormente lavado com pequenos volumes de acetona fria. O produto obtido foi isolado como um sólido branco. (0.293 g, 45%); P.f. 172 – 173 °C; P.f. (Lit.) 168 °C[51]

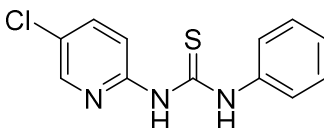
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 7.10-7.21 (ArH, m, 5H), 7.30-7.38 (NHCCHCH, m, 2H), 7.45-7.52 (NHCH, m, 2H), 9.73 (CSNH, s, 2H).

^{13}C -RMN (500 MHz, DMSO) $\delta(\text{ppm})$: 115.4 (NHCCH), 124.6 (NHCCHCHCH), 128.9 (NHCCHCH), 136.2 (NHCCHCHCF), 158.7 (CSNHCAr), 160.6 (CF), 180.5 (NHCSNH).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 1212 (F, N-CS-N), 1339 (F, C-F), 1450 (m, C=C), 1505 (F, C-N), 3012 (m, =C-H), 3211 (m, N-H).

ES m/z = 247 (M^+H^+)

3-(5-cloropiridin-2-il)-1-fenil tioureia (15)



15

Seguindo o procedimento descrito em 5.2.2.1 partiu-se de fenilisotiocianato (2.3 mmol, 0.28 mL) e 2-amina-5-cloropiridina (2.3 mmol, 0.30 g) em acetonitrilo.

Obteve-se uma solução límpida incolor, evaporou-se o solvente no evaporador rotativo e o resíduo obtido foi purificado por coluna de cromatografia (sílica gel, éter de petróleo e acetato de etilo, 4:1). As frações com produto foram recolhidas e evaporadas à securo em alto vácuo. O resíduo obtido foi triturado com uma solução de isopropanol e foi filtrado em alto vácuo.

O produto obtido 15 foi isolado como um sólido branco. (0.231 g, 38%); P.f. 185 °C; P.f. (Lit.) 192 °C [52]

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 7.42-7.51 (NHCCHCH, m, 2H), 7.60-7.67 (NHCCH, m, 2H), 7.84 (NCCH, d, *J*= 7.8 Hz, 1H), 7.94-8.03 (CCHCHCH, m, 1H), 8.59 (CCICH, d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.98 (NCH, s, 1H), 11.66 (NCNHCS, s, 1H), 13.45 (CNHCS, s, 1H).

¹³C-RMN (500 MHz, DMSO) δ(ppm): 110.6 (NHCCH), 123.2 (CCI), 123.5 (NHCCH), 124.6 (NHCCHCHCH), 137.8 (CCICHCH), 139.3 (NHCAr), 146.9 (NHCNCH), 154.9 (NHCN), 181.4 (NHCSNH).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 819 (F, C-Cl), 1185 (F, =C-N), 1255 (m, C-N), 1344 (m, N-CS-N), 1468 (F, C=C), 1600 (F, C-N), 3019 (m, =C-H), 3150 (m, N-H), 3209 (m, N-H).

ES *m/z* =264 (M⁺H⁺)

Composto 16

Partiu-se do correspondente isotiocianato (1 eq.) segundo o procedimento 5.2.2.2 e de uma solução de amina (2.5 eq.) (procedimento 5.2.2.1) obtendo-se uma solução límpida amarela. Evaporou-se o solvente no evaporador rotativo e o resíduo obtido foi triturado com uma solução de isopropanol e foi filtrado em alto vácuo. O produto 16 foi isolado como um sólido amarelo e seco em estufa de vácuo a 40 °C. (0.339 g, 37%); P.f. 154 – 157 °C

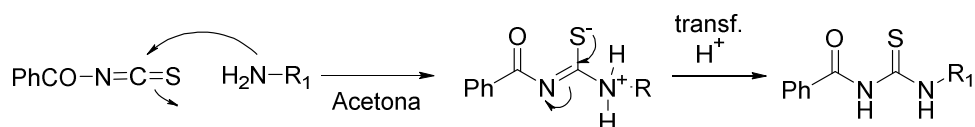
6 Discussão de resultados

6.1 Preâmbulo

Esta tese de Mestrado teve como âmbito a síntese de aciltioureas e tioureas, em ambos os casos recorrendo a dois processos de síntese conforme os procedimentos descritos e adaptados da literatura [38], [39], [40], [41]. Assim, no próximo capítulo 6.2 serão abordadas as sínteses das aciltioureas e no capítulo 6.3 as sínteses desenvolvidas para as tioureas. A caracterização física e espectral foi realizada por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , espectroscopia de IV e HPLC-MS, rendimento, pureza (observação visual) e ponto de fusão. O ponto de fusão da literatura foi reportado sempre que se encontrou na literatura (Reaxys). No capítulo 6.5 são apresentados os resultados de actividade biológica contra dois microorganismos conhecidos, *S.aureus*, *E. coli*.

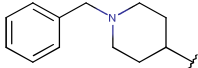
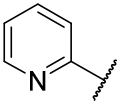
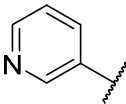
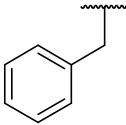
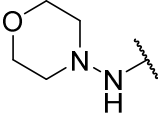
6.2 Síntese de aciltioureas

Neste capítulo vão ser analisadas as aciltioureas (**1** a **10**) preparadas por duas metodologias diferentes, com diferentes nucleófilos, embora exista um caso em que o produto esperado não se formou dado origem a outra classe de compostos – amidas (composto **6**). Os rendimentos obtidos foram no geral superiores para o método 5.2.1.1 quando comparados com os rendimentos obtidos pelo método em que se prepara o isotiocianato *in situ* (5.2.1.2). Relativamente ao procedimento, os derivados das aciltioureas **1** a **10** foram obtidos pela reação de condensação de aminas substituídas quer com grupos alifáticos quer com aromáticos heterocíclicos e benzoílisotiocianato segundo a reacção descrita no esquema 6.1 (método 5.2.1.1) e a sua caracterização experimental será apresentada na tabela 6.1. O mecanismo envolve o ataque nucleófilo da amina ao carbono electrófilo do isotiocianato. As aciltioureas foram obtidas com rendimentos moderados a bons para os compostos **2**, **4** e **5** excepto para os compostos **1**, **3**, **7**, **8**, **9** e **10** que foram obtidos com rendimentos baixos (tabela 6.1).

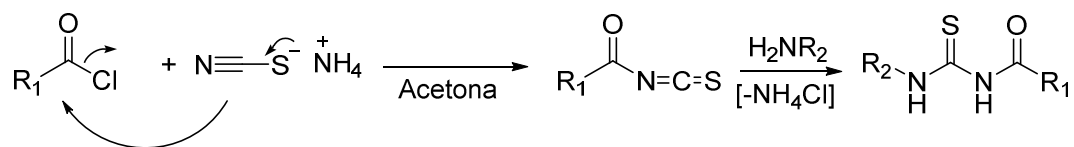


Esquema 6.1: Mecanismo geral para a síntese das aciltioureas por reação entre benzoílisotiocianato e diferentes aminas.

Tabela 6.1: Caracterização experimental das aciltioureas **1** a **5** segundo procedimento 5.2.1.1 [38]

Composto	R ₁	Rendimento (%)	Pureza (%)	Ponto fusão (° C)	Método
$ \begin{array}{c} \text{S} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{R}_1\text{-N}-\text{C}=\text{N}-\text{C}-\text{Ph} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} $					
1		26	>95	112-114	5.2.1.1
2		67	>95	138-142	5.2.1.1
3		38	>95	165-167	5.2.1.1
4		72	>95	125-126	5.2.1.1
5		68	>95	134-136	5.2.1.1

O segundo método utilizado para a obtenção de aciltioureas (**7** a **10**), envolveu a preparação *in situ* do acilisotiocianato por reacção do cloreto de ácido na presença de tiocianato de amónia. Posteriormente foi adicionada a amina substituída segundo a reacção descrita no esquema 6.2 (método 5.2.1.2) obtendo-se o produto esperado contudo, os rendimentos obtidos foram muito baixos (tabela 6.2), o que não seria de esperar para este tipo de reacção, mas pode ter acontecido devido à reactividade e instabilidade dos isotiocianatos e à etapa de purificação donde advém sempre perda de produto.



Esquema 6.2: Mecanismo geral para a síntese das aciltioureas por preparação *in situ* do acilisotiocianato

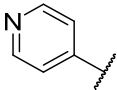
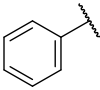
Tabela 6.2: Caracterização experimental das aciltioureas **7** a **10** segundo procedimento 5.2.1.2 [39]

Composto	R ₁	R ₂	Rendimento (%)	Pureza (%)	Ponto fusão (° C)	Método
7			5	90-95	144-150	5.2.1.2
8	X	Y	18	90-95	186-190	5.2.1.2
9			21	>95	190-205 (dec.)	5.2.1.2
10			31	>95	191-206 (dec.)	5.2.1.2

6.2.1 Amidas

Verificou-se que numa situação que o produto esperado a aciltioureia não se formou tendo-se isolando como subproduto o composto **6** (tabela 6.3). Este caso ocorreu pois, aparentemente por TLC este era o produto maioritário e o produto esperado, mas dado que se obteve o subproduto o que se pode concluir é que o R_f quer do subproduto quer do produto seriam equivalentes e por isso o produto não foi isolado com sucesso.

Tabela 6.3 – Caraterização da amida obtida como subproduto no processo 5.2.1.1

Composto	R ₁	R ₂	Rendimento (%)	Pureza (%)	Ponto fusão (° C)	Método
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1\text{---N---C---R}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$						
6			24 %	90-95	174-180°C	5.2.1.1

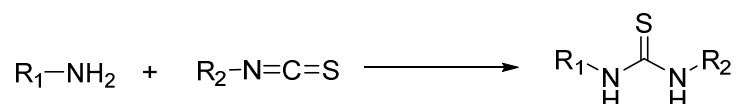
6.3 Síntese de tioureias

Para o caso das tioureias, também se utilizaram dois métodos comparativamente às aciltioureias (método 5.2.2.1 e o método 5.2.2.2) como se pode verificar pela tabela 6.3.

No método 5.2.2.1 utilizaram-se dois solventes em que, para a síntese do composto **11** o solvente utilizado foi o tolueno e nos restantes compostos **12-16** foi utilizado o acetonitrilo.

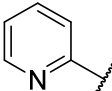
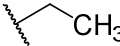
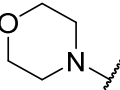
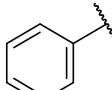
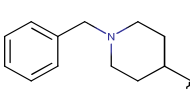
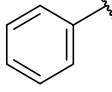
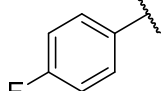
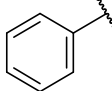
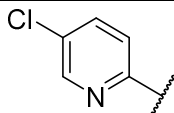
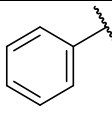
Para o primeiro método (5.2.2.1) em que se recorreu à reação de isotiocianatos com aminas (esquema 6.3) o mecanismo da reacção é em tudo idêntico ao apresentado no esquema 6.1.

Do ponto de vista experimental o único parâmetro variável foi o solvente.

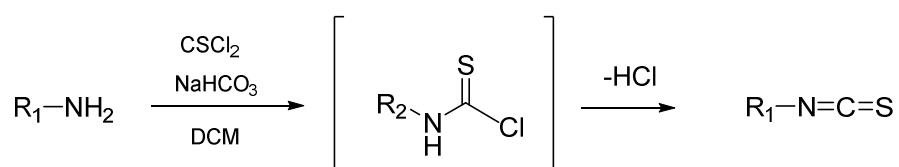


Esquema 6.3: Esquema reaccional geral da síntese de tioureias[40]

Tabela 6.4: Caracterização experimental das tioureias 11 a 16 segundo procedimento 5.2.2.1 e 5.2.2.2

Composto	R ₁	R ₂	Rendimento (%)	Pureza (%)	Ponto fusão (° C)	Método
$R_1-NH-C(=S)-NH-R_2$						
11			19	>95	123-124	5.2.2.1
12			79	90-95	163-164	5.2.2.1
13			78	>95	157	5.2.2.1
14			45	>95	172-173	5.2.2.1
15			38	>95	185	5.2.2.1
16	Z	W	37	90-95	154-157	5.2.2.2

Tal como para a preparação de aciltioureas também neste caso se recorreu à preparação do isotiocianato *in situ* (método 5.2.2.2) reagindo uma solução de amina em diclorometano com uma solução de tiofosgénio na presença de uma base (hidrogenocarbonato de sódio) a baixas temperaturas (esquema 6.4). Embora sendo um procedimento delicado, pois o tiofosgénio é muito tóxico, obteve-se um bom rendimento para o isotiocianato preparado (composto **16**)[41].



Esquema 6.4: Esquema geral para a preparação do isotiocianato *in situ* para o composto 16 [41]

6.4 Caracterização espectral

Neste trabalho foram sintetizados quinze derivados das tioureias, que através da análise espectroscópica de IV, verificou-se que apresentam uma banda característica do grupo tioureia com bandas fortes entre $1200\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$. Para as aciltioureias **1-5** e **7-10**, o grupo benzoílo é também identificado no IV pela banda de vibração forte do grupo carbonilo a aproximadamente 1650 cm^{-1} característico das amidas. Também característico do grupo benzoílo são os desvios no espectro de ^1H -RMN dos prótons nomeadamente os prótons *orto* que aparecem como um duplete a aproximadamente 8 ppm.

Ainda relativamente à espectroscopia de ^1H -RMN e às aciltioureias, os prótons que aparecem mais desblindados são os dos grupos NH dos compostos **1-4**, **7** e **7-10** que exibem dois singletos característicos entre 10.95-13.30 ppm e 11.26-11.85 ppm, respetivamente.

Os desvios entre 7-28-8.76 ppm que aparecem como multipletos representam os prótons da piridina nos compostos **2** e **3** que, quando está substituída por um halogéneo na posição meta, compostos **7** e **15** apresenta desvios mais elevados devido ao efeito electronegativo deste átomo fazendo com que os prótons fiquem mais desblindados aparecendo a 8.51-8.98 ppm pois sofrem o efeito de desblindagem por efeito indutivo.

Também característico dos compostos **5** e **12** são os desvios para os seus prótons na heterociclo alifático que se apresentam como multipletos entre 2.70-3.73 ppm e 3.60-4.24 ppm, esta diferença entre os prótons é explicada pelo fato dos prótons estarem mais próximos de um átomo electronegativo logo, mais desblindados.

Para o composto **1** e **13**, observa-se a existência de 8 prótons bastante blindados, que sofrem o efeito de doação do grupo N e que são característicos do heterociclo alifático substituído.

A partir dos espectros de ^{13}C -RMN, observa-se para os compostos **1-5** e **7-10** um sinal entre 178.3-181.0 ppm característico do carbono tiocarbonílico. Para o composto **6** apenas se verifica a presença do grupo C=O a 167.8 ppm pois é uma amida. Para os compostos **5** e **12** temos um sinal entre 65.5-67.0 ppm para o carbono CH_2O e um sinal também característico é o que temos no composto **11** para o carbono do CH_3 e CH_2 do grupo etil a 14.5 ppm e a 39.6 ppm, respetivamente.

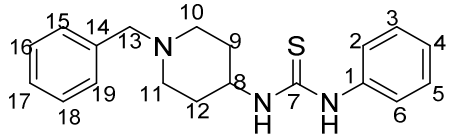
A zona aromática que não possui substituição apresenta desvios entre 128.3-129.9 ppm para todos os compostos analisados enquanto, para os carbonos do anel piridil observam-se desvios a um campo mais baixo entre 146.0-148.1 ppm.

De acordo com a base de dados Reaxys o composto **13** não está descrito na literatura justificando-se uma caracterização total da sua estrutura. Neste capítulo de discussão será confirmada a estrutura através da análise de dados experimentais por espetrometria de ressonância magnética nuclear de próton ^1H -RMN, de carbono ^{13}C -RMN, análise bidimensional HMBC-RMN, HSQC-RMN, por IV e por espetrometria de massa ES.

6.4.1 Caracterização espectral do composto 13

A estrutura do composto **13** e os deslocamentos químicos de ^1H -RMN e de ^{13}C -RMN são apresentados na tabela 6.7 e 6.8, respectivamente. Pelo espectro de ^1H -RMN (figura 6.3) confirmou-se a estrutura do produto e observou-se claramente a existência de prótons aromáticos e alifáticos. Os prótons alifáticos apresentam desvios a um campo alto de 3.35 ppm que aparecem como singletos característicos de CH_2 e na zona compreendida entre 7.64-7.70 ppm encontram-se multipletos que integram para os prótons do grupo aromático substituído. Os prótons N-H exibem dois singletos fortes e característicos a 7.45 e 9.39 ppm. Os desvios observados a campo alto dizem respeito aos prótons do heterociclo saturado da piperidina, e apresentam-se como multipletos para os prótons H9 e H12 entre 1.49-1.90 ppm e para os prótons H10 e H11 a 2.05-2.75 ppm.

Tabela 6.5 – Deslocamentos químicos de ^1H -RMN (ppm) para o composto 13

		
Protão	δ (ppm)	Correspondente atribuição da parte experimental
H9, H12	1.49-1.90	NHCHCH
H10, H11	2.05-2.75	CHCH_2CH
H13	3.46	NCH_2C
H8	4.26	CSNHCH
ArH	7.21-7.37	CH_2CArH
NH (C8-C7)	7.45	CHNHCS
H2,H6	7.64-7.70	NHCCCH
NH (C7-C1)	9.39	CNHCS

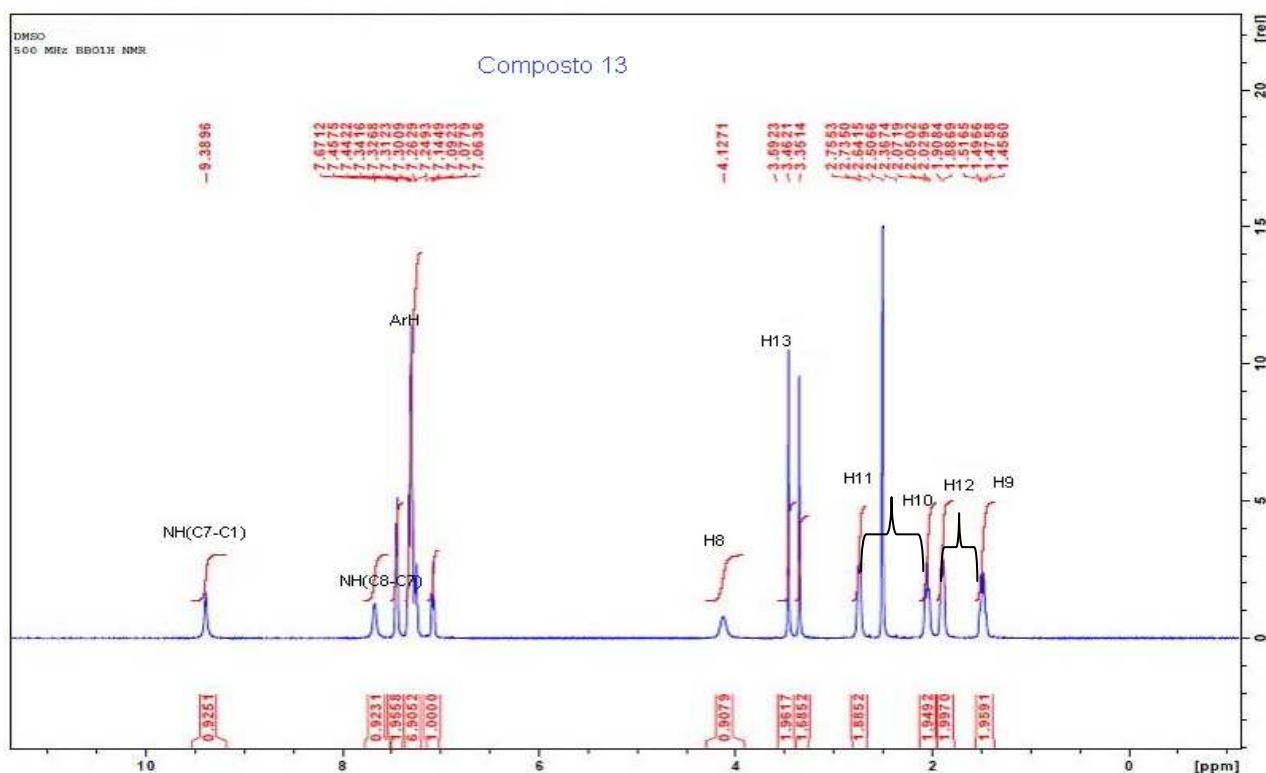


Figura 6.1 – Espetro de RMN de ^1H do composto 13

Mediante a análise bidimensional HMBC e HSQC, foi possível determinar o acoplamento existente entre carbonos e hidrogénios distantes a duas, três ou quatro ligações ou detectar acoplamentos de curto alcance, a apenas uma ligação, respectivamente. Como se observa no espectro de HMBC (figura 6.4), o C13 está correlacionado com os protões do aromático H15 (3 ligações), H16 (3 ligações) e H17 (4 ligações) e ao singlete do protão do grupo CH_2 - H13. Por outro lado também é visível que os carbonos C15 e C19 estão correlacionados a uma e duas ligações com os protões H15, H16, H17, H13, respectivamente e os carbonos C16, C17 e C18, estão correlacionados com H15, H16 e H17. Ainda relativamente ao aromático e, como seria de esperar o C14 está correlacionado com H15, H16, H17, e H13. No heterocíclico alifático, observa-se que os carbonos C10 e C11 estão correlacionados com H13, H11, H12 e H9.

Pelo espectro de HSQC, obteve-se mais uma confirmação do acoplamento directo entre carbonos e hidrogénios (figura 6.5).

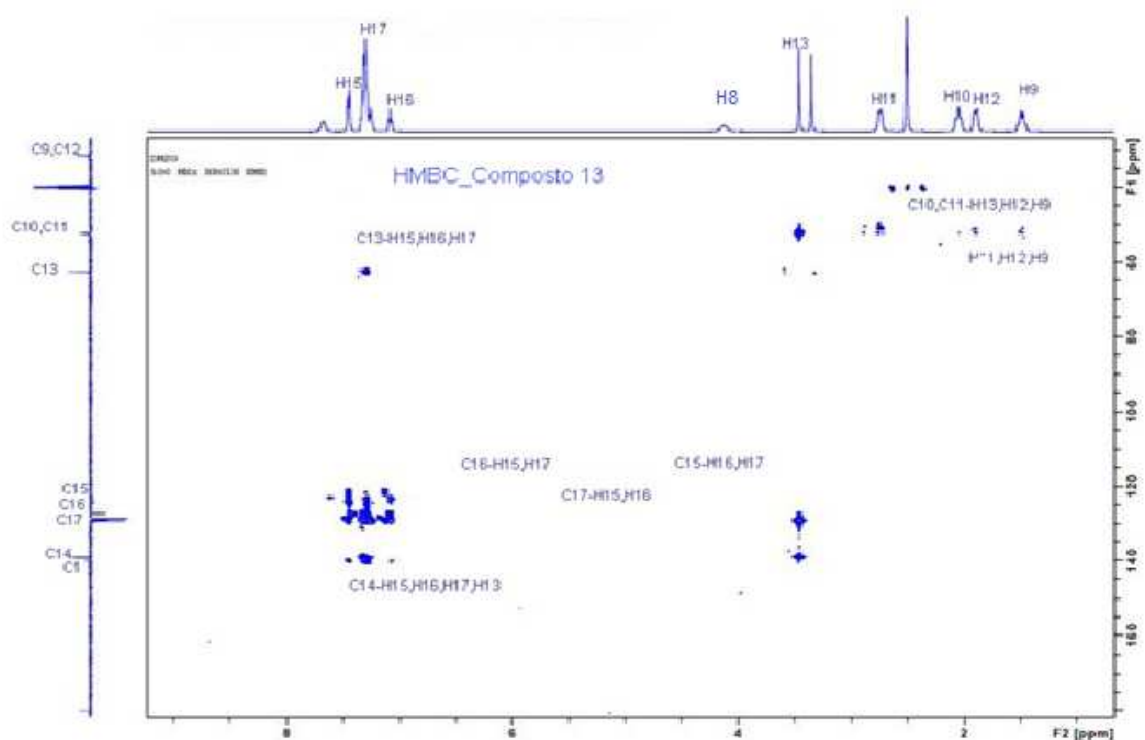


Figura 6.2 – Espetro de HMBC para o composto 13.

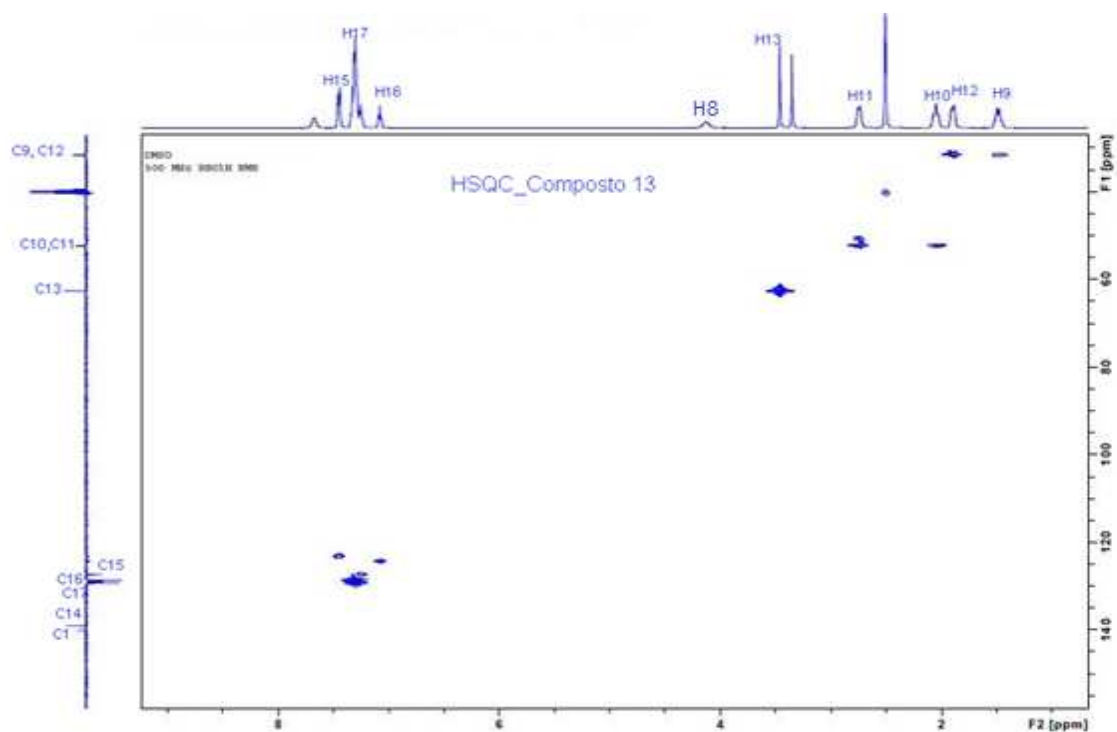
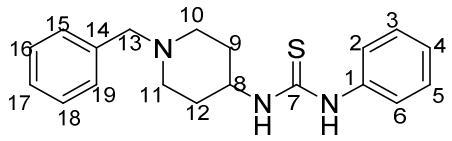


Figura 6.3 – Espetro de HSQC para o composto 13

A partir do espectro de ^{13}C -RMN (figura 6.6), observou-se para o composto **13** (tabela 6.6) um sinal a 179.9 ppm característico do carbono tiocarbonílico, e outro sinal a 62.6 ppm característico do carbono CH_2 ligado ao N do heterociclo. Também se observa um sinal característico a um campo mais baixo de 139.0 ppm para o carbono aromático ligado a um grupo alifático. Ao desvio de 31.6 ppm temos o carbono do heterociclo alifático substituído e como característicos para estes tipos de compostos os também já conhecidos aromáticos na zona de 123.1 a 129.2 ppm.

Tabela 6.6 – Deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN (ppm) para o composto 13

		
Carbono	δ (ppm)	Correspondente atribuição da parte experimental
C9,C12	31.6	NHCHCH
C8	51.1	NHCH
C10,C11	52.3	$\text{NHCHCH}_2\text{CH}_2$
C13	62.6	NCH_2
C2,C6	123.1	NHCCH
C15	125.3	CH_2CCH
C16	128.3	CH_2CCHCH
C17	129.2	$\text{CH}_2\text{CCHCHCH}$
C14	139.0	CH_2C
C1	140.0	NHCAr
C7	179.9	NHCSNH

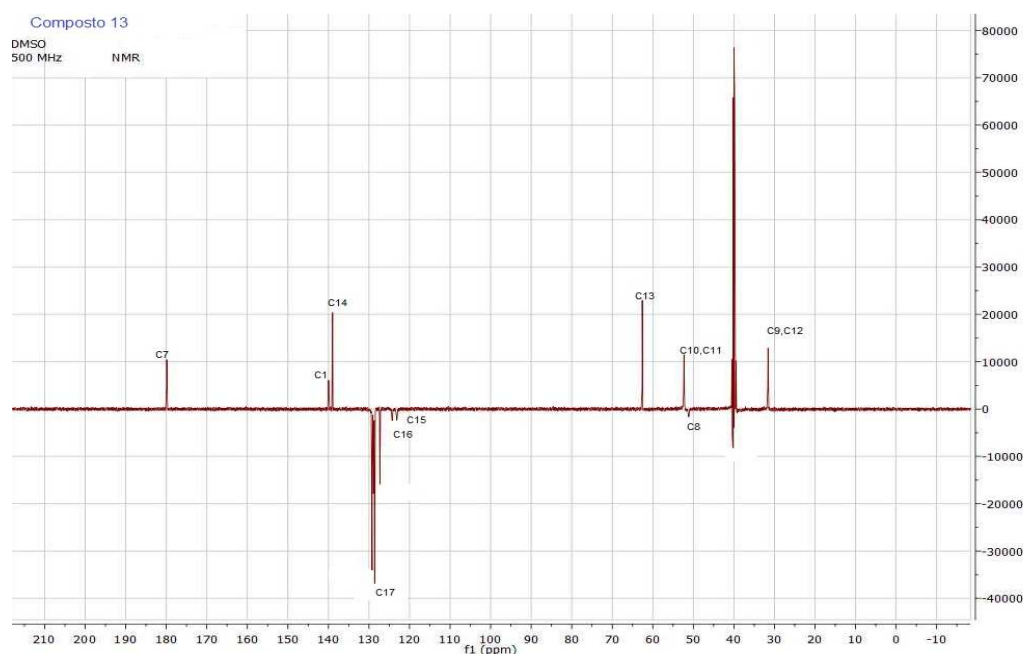


Figura 6.4 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto 13

No espectro de IV do composto **13** (figura 6.7), as bandas entre 3205-3042 cm^{-1} correspondem às vibrações $\nu(\text{N-H})$ e a banda média a 2815 cm^{-1} é relativa à vibração $\nu(\text{C-H})$. Também se observam bandas fortes a 1557 e 1452 cm^{-1} características das ligações $\text{C}=\text{C}$ de anéis aromáticos assim como, uma banda de absorção forte a 1494 e 1251 cm^{-1} referente à vibração $\nu(\text{C-N})$. A banda forte a 1142 cm^{-1} é relativa ao grupo (N-CS-N) .

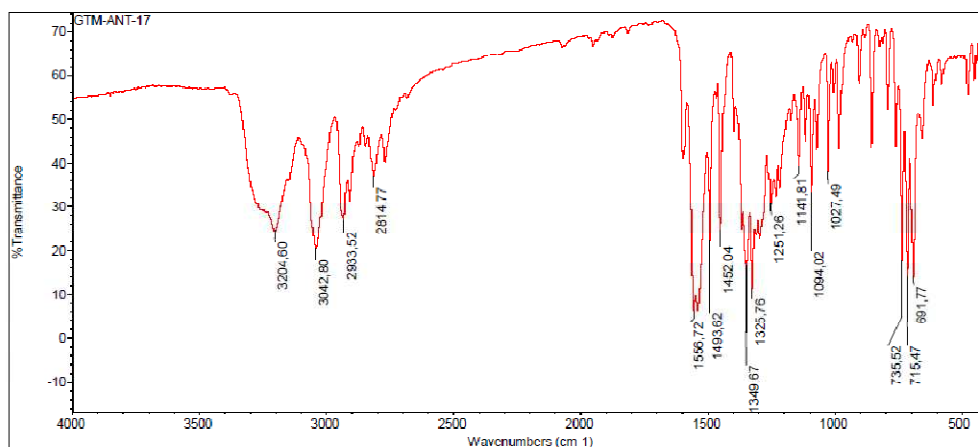


Figura 6.5 – Espectro de infravermelho em KBr do composto 13

O peso molecular do composto **13** foi confirmado por espectrometria de massa ES apresentando o pico do ião molecular (M^+) a $m/z=326$, sendo esse um sinal intenso do espectro de massa.

6.5 Ensaios biológicos

6.5.1 Análise SAR

Nesta análise diferentes compostos foram avaliados quanto ao perfil antibacteriano contra dois microrganismos, um gram-positivo e um gram-negativo usando como controlo positivo a levofloxacina e como avaliação a concentração mínima inibitória a 50% (MIC₅₀). Os testes foram realizados em duplicado e em triplicado e os resultados apresentam-se na tabela 6.7, 6.8 e 6.9.

Tabela 6.7 – Resultados da estrutura atividade para as aciltioureas

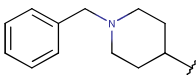
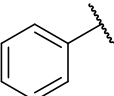
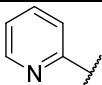
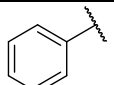
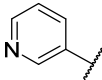
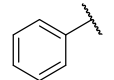
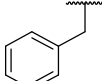
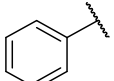
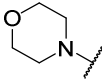
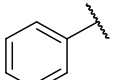
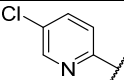
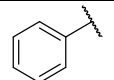
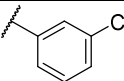
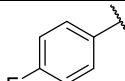
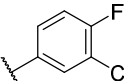
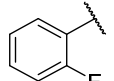
Composto	R ₁	R ₂	MIC ₅₀ (μM)		logP ¹	logS ¹	tPSA ¹
			S. aureus	E.coli			
1			>600	>600	3.1	-5.2	44.4
2			>100	>100	2.0	-4.1	53.5
3			>100	>100	2.0	-3.5	53.5
4			>600	>600	2.7	-4.1	41.1
5			>600	>600	1.8	-2.4	41.6
7			>100	>100	2.9	-4.8	53.5
8	X	Y	3.7<MIC ₅₀ <33	>100	2.7	-5.2	105.3
9			200<MIC ₅₀ <600	200<MIC ₅₀ <600	3.8	-5.4	41.1
10			200<MIC ₅₀ <600	200<MIC ₅₀ <600	3.6	-5.6	41.1

Tabela 6.8 – Resultados da estrutura atividade para as tioureias

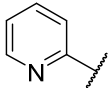
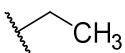
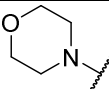
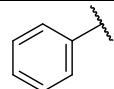
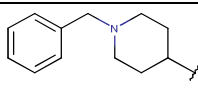
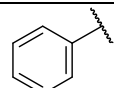
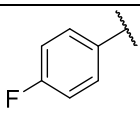
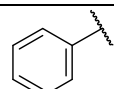
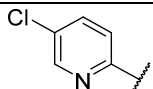
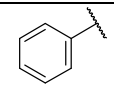
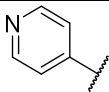
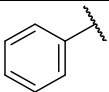
Composto	R ₁	R ₂	MIC ₅₀ (μM)		logP ¹	logS ¹	tPSA ¹
			<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>			
11			>600	>600	0.9	-2.1	36.4
12			>600	>600	1.3	-2.2	36.5
13			200<MIC ₅₀ <600	200<MIC ₅₀ <600	2.7	-4.7	27.3
14			>600	>600	2.6	-4.2	24.1
15			>600	>600	2.5	-4.2	36.4
16	Z	W	3.7<MIC ₅₀ <33	>100	3.0	-4.3	75.9

Tabela 6.9 – Resultados da estrutura atividade para a amida

Composto	R ₁	R ₂	MIC ₅₀ (μM)		logP ¹	logS ¹	tPSA ¹
			<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>			
6			>600	>600	2.0	-2.5	41.5

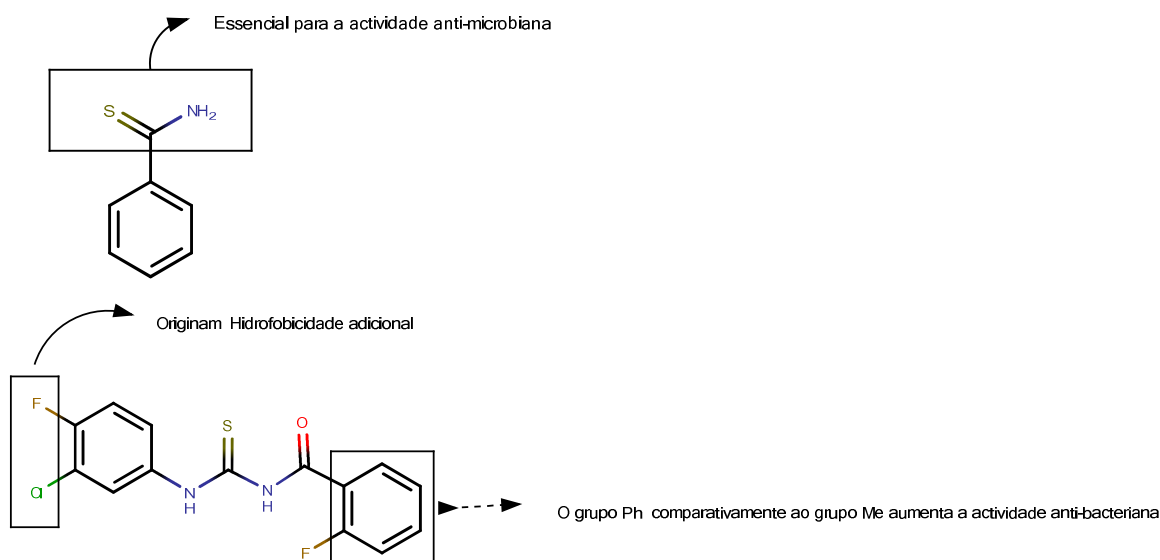
1 – Valores previstos pelo “ChemDraw “ versão 15.0

Com os resultados observados nos testes de sensibilidade, verificou-se que a atividade antibacteriana apresentada pelos compostos testados está relacionada com a sua estrutura, seja pela presença dos substituintes ou pela posição ocupada pelos mesmos na molécula. As modificações estruturais, entre aminas heterocíclicas, aromáticas, assim como a introdução de grupos eletroatratores e a troca de substituintes na posição *para* favoreceram o aparecimento de atividade antibacteriana.

Pela sua versatilidade do ponto de vista sintético, as tioureias são compostos cada vez mais importantes devido à sua capacidade de se tornarem precursores na área da síntese orgânica.

Como por exemplo, temos o grupo tioamida que é muitas vezes responsável pela atividade antimicrobiana (esquema 6.5).

Por outro lado, o número de fármacos com flúor nas suas estruturas está a aumentar significativamente pois, as propriedades em determinadas posições da molécula visam aumentar a sua meia-vida no organismo, modelar as suas propriedades físico-químicas (acidez, basicidade e lipofilicidade), pode gerar mudanças conformacionais e aumentar a afinidade do fármaco por uma proteína-alvo e a permeabilidade da parede ou membrana celular.



Esquema 6.5 – Grupos substituintes e sua atividade biológica

Após a realização dos testes de actividade antimicrobiana e os resultados obtidos (tabela 6.7, 6.8 e 6.9), observou-se alguma sensibilidade para os dois microorganismos nos compostos **9**, **10**, e **13** para o intervalo de concentração $200 < MIC_{50} < 600$ (tabela 6.7, 6.8 e 6.9). Os resultados de MIC_{50} para os compostos **8** e **16** demonstraram seletividade para o *S. aureus* apresentando valor de MIC_{50} entre 3.7 e 33 μM , sendo identificado um grupo funcional específico que lhes confere atividade.

Os compostos **2**, **3** e **7** foram inativos a uma concentração inferior a 100 μM e, por isso será necessário confirmar a atividade a uma concentração superior.

A análise dos substituintes das tioureias e aciltioureias demonstrou que a introdução de grupo alifático (composto **12**) com menor basicidade não apresentou atividade antibacteriana para os microorganismos estudados, mas por outro lado a introdução de halogéneos com massa molar mais pequena (substituintes m,p-directores) - composto **9** e **10** - no anel aromático apresentaram vestígios de actividade antibacteriana para os microorganismos estudados (tabela 6.9), não sendo significativamente afetada pela introdução de mais grupos eletroatratores. Esta atividade pode ser atribuída à presença de substituintes electronegativos que aumentam a lipofilicidade dos compostos.

Por outro lado constatou-se que os compostos com grupos heteroaromáticos, benzílicos e alifáticos **1**, **4**, **5**, **11**, **12** e **15** são inativos para a atividade determinada.

Comparando as aciltioureias e as tioureias (composto **1** e **13**), verificou-se que as tioureias apresentam valores de MIC_{50} entre 200 μM e 600 μM revelando vestígios de atividade para os dois microorganismos em estudo enquanto as aciltioureias não apresentam qualquer tipo de atividade. Este facto é contraditório pois, a introdução do grupo acilo que confere mais um grupo funcional que pode participar em pontes de hidrogénio deveria aumentar a solubilidade e assim revelar atividade, o que não se verificou. Por outro lado, os derivados das aciltioureias apresentam-se mais activas contra as bactérias gram-positivas do que contra as gram-negativas, podendo esta diferença ser atribuída ao fato da parede celular ser diferente.

Propriedades físico-químicas

De acordo com o descrito na introdução, os dezasseis compostos também foram teoricamente avaliados por um conjunto de três propriedades físico-químicas fundamentais para o desenvolvimento e investigação de novos fármacos que incluíram a previsão da lipofilicidade ou coeficiente de partição ($\log P^1$), solubilidade ($\log S^1$) e área superficial polar ($tPSA^1$) (valores previstos pelo "Chemdraw", versão 15.0).

Fazendo uma análise estrutura-propriedade, constatou-se que os valores obtidos para o logP variaram entre $0.88 \leq \log P \leq 3.79$, o que nos indica que quanto maior for este valor (entre 0 e 3), menor será a hidrofiliidade, resultando numa maior permeabilidade membranar, ou seja, maior será a capacidade desta molécula atravessar as membranas plasmáticas, constituídas pelas camadas fosfolipídicas. Mas, por outro lado se o valor for muito superior a 3 podem originar toxicidade. Observou-se também que a introdução de um grupo halogéneo na posição *meta* (composto **9**) aumentou a lipofiliidade, mas esta não é significativamente alterada após a introdução de outro grupo halogéneo (composto **10**).

Para os valores de solubilidade que é outro dos parâmetros muito importantes, o intervalo recomendado para que uma molécula tenha uma boa disponibilidade oral situa-se entre $-6 \leq \log S \leq 0.5$ e, no caso em estudo os valores obtidos variaram entre $-5.6 \leq \log S \leq -2.1$, o que significa que, temos compostos que apresentam boa disponibilidade para que possam atingir o sítio-alvo e realizar o seu efeito.

Relativamente aos resultados obtidos para a polaridade, valor dado pela tPSA, verificou-se uma diferença significativa de valores nos compostos analisados encontrando-se entre $24.1 \leq \text{tPSA} \leq 105.3$. Comparando os valores de tPSA dos compostos sintetizados verificaram-se valores mais baixos para as tioureias (compostos **11-15**) dado que não têm a contribuição do átomo de oxigénio (que tem maior peso molecular), comparativamente às aciltioureias. A maior parte dos compostos, aproximadamente 80% apresenta valores de tPSA inferiores a 60Å, o que nos indica que o transporte através da membrana celular vai ser melhor para estes compostos. Contrariamente ao esperado os compostos que apresentam actividade têm valores de tPSA superiores a 60Å, (composto **8** e **16**), o que sugere a optimização destes compostos para valores abaixo do valor ideal, dependendo do seu objetivo final.

Estes dados foram analisados com o objectivo de se identificarem tendências, dado que a correlação existente entre a lipofiliidade e a atividade não é linear. Então, definiu-se um conjunto de valores de propriedades que melhor podem definir uma probabilidade elevada de sucesso clínico. A informação obtida através desta análise, em conjunto com outras, poderá ser utilizada para desenvolver fármacos com melhor biodisponibilidade e menor toxicidade.

Pela análise efetuada com base na atividade e propriedades físico-químicas determinadas constatou-se que os potenciais candidatos a fármacos seriam os compostos **8**, **16**, **9**, **10** embora, para aumentar a probabilidade de sucesso o processo de “design” deveria focar-se em todas as propriedades das moléculas.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram realizadas 16 sínteses para a preparação de aciltioureas e tioureas com a finalidade de se testar a sua atividade biológica *in-vitro* para dois microrganismos conhecidos (*S.aureus* e *E.coli*). Quer para a preparação das aciltioureas como das tioureas foram utilizadas metodologias distintas, em que uma delas foi pela obtenção da reação de condensação entre aminas substituídas e isotiocianatos e outra foi preparando o isotiocianato *in situ*. Confirmou-se por métodos espectroscópicos e ponto de fusão o sucesso na síntese de quinze dos dezasseis derivados de tioureas, de entre as quais a tiourea (composto **13**) que não se apresenta descrita na literatura, tendo sido apresentada e discutida a sua caracterização por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , espectroscopia de IV e HPLC-MS, rendimento, pureza (observação visual) e ponto de fusão.

As relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica também foram estudadas através da determinação do MIC_{50} e o cálculo teórico de propriedades físico-químicas que possibilitaram um conhecimento prévio de algumas das propriedades que podem influenciar um estudo ADME.

Concluiu-se que a atividade biológica dos compostos sintetizados está associada a uma unidade estrutural em particular de um grupo e a sua bioatividade depende das modificações efetuadas, envolvendo substituição de átomos, ou grupos de átomos numa molécula como se pode concluir pelos resultados obtidos na determinação efetuada do MIC_{50} para os diferentes compostos. Para o composto **8** e composto **16** é possível atribuir atividade *in vitro* dado que apresentam um grupo funcional específico que, associado ao grupo funcional tiourea lhes permitiu um aumento da atividade farmacológica.

Posteriormente, seria de avaliar o seu potencial em outras estirpes de microrganismos que não as estudadas e prosseguir com a evolução destes derivados pois dada a sua versatilidade este grupo de compostos é uma fonte de esperança para contornar os problemas que advêm da multi-resistência bacteriana.

8 BIBLIOGRAFIA

- [1] Cabral, Célia e Pita, Rui J. "Alcalóides – Relevância na Farmácia e no Medicamento". *Centro de estudos interdisciplinares do século XX - Grupo de história e sociologia da ciência e da tecnologia* (2015) acesso em 20/08/2016 em <http://www.uc.pt/ffuc/patrimonio_historico_farmaceutico/exposicoes/exposicoestemporarias/1exposicao.pdf>.
- [2] Pita Jr. "Plantas medicinais na primeira farmacopeia oficial portuguesa". *Pharmacopeia geral*, **30**, p.57 - 68 (1995).
- [3] Dias J. P. S. "Homens e medicamentos - Uma introdução à história da farmácia, da farmacologia e da terapêutica e o legado terapêutico da antiguidade". *Historiographusdigital* acesso em 30/07/2016, em <<http://www.historiographus.org/digital/documento/2>>
- [4] Errecalde, O. J. "La evolucion del medicamento en la historia". *Academia nacional de agronomia y veterinaria*. (2009)
- [5] Frearson Julie A. and Collie Iain T. "HTS and hit finding in academia – from chemical genomics to drug discovery". *Science Direct*, **14**, p.1150–1158 (2009).
- [6] Steinmetz Karen L. and Spack E. G. "The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications". *BMC Neurol.*, **9** Suppl 1:S2 (2009).
- [7] Singh D. "Defining desirable natural product derived anticancer drug space: optimization of molecular physicochemical properties and ADMET attributes". *ADMET DMPK*, **4**, p.98 (2016).
- [8] Rudin M. & Weissleder R. "Molecular imaging in drug discovery and development". *Nat. Rev. Drug Disc.*, **2**, p.123–131 (2003).
- [9] Ponce de León-rosales S. "Arredondo-hernández R. and López-vidal Y. Resistance to antibiotic: A serious global problem". *División de Investigación, Facultad de medicina - Gaceta Medica de Mexico*, p. 2–9 (2015).
- [10] Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, "Resistência Aos Antimicrobianos (2010). Acesso em 02/08/2016 em <<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/DoencasInfecciosas/AreasTrabalho/ResistencAnti/Paginas/inicial.aspx>>.
- [11] Elzbieta K. Jagusztyn - Krynicka and Agnieszka W. "The decline of antibiotic era - new approaches for antibacterial drug discovery". *Pol. J. Microb.*, **57**, p.91-98 (2008).
- [12] Bbosa Godfrey S., Mwebaza N., Odda J., Kyegombe David B. and Ntale M. "Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance". *Health*, **6**, p. 410–425 (2014).
- [13] Avorn J. L., Barret J. F., Davey P. G., McEwen S. A., O'Brien T.F., Levy S. B. "Antibiotic Resistance". *World Health Organ.*, p.129-131 (2001).
- [14] Qixun Zhao, Xian-Zhi Li, Ramakrishnan Sri Kumar, Poole K. "Contribution of Outer Membrane Efflux Protein OprM to Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Independent of MexAB". *J. Antimic. agents and Chemot.*, **42**, p.1682–1688 (1998).
- [15] Kohanski Michael A., Dwyer Daniel J. and Collins James J. "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks". *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, p.423–435 (2010).

- [16] Davidson Michael W. "Cell Biology and Microscopy Structure and function of Cells & Viruses". *Florida State University Foundation* (1995), acesso em 15/08/2016, em <<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/index.html>>
- [17] Hooper D. C. "Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones - clinical infectious diseases". *J. Clin. Infect. Dis. Am.*, **32** p. 9–15 (2001).
- [18] Hunt D. M. (2015). "Bacteriology - Bacterial cell envelope, spores and macromolecular biosynthesis." In *Microbiology and Immunology On-line*, Hunt, R. C. editor, *University of South Carolina*, acesso em 03/08/2016, em <<http://www.microbiologybook.org/mhunt/flu.htm>>
- [19] Lebar M. D., Lupoli T. J., Tsukamoto H., May J. M., Walker S., Kahne D. "Forming crosslinked peptidoglycan from synthetic Gram-negative Lipid II". *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, p.4632-4635 (2013).
- [20] Shakeel A., Altaf Ataf A., Qureshi Ashfaq M., Badshah A. "Thiourea Derivatives in Drug Design and Medicinal Chemistry: : A Short Review". *J. Drug Des. Med. Chem*, **2**, p.10–20 (2016).
- [21] Normark Henriques B. "Evolution and spread of antibiotic resistance". *J.Int. Med.*, **252**, p.91–106 (2002).
- [22] Ziegler-Skylakakis . K., Kielhorn J. "Thiourea". *World Health. Organ.* (2003) acesso em 31/08/2016, em <<http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad49.pdf>>
- [23] Sahu S., Sahoo Prangya Rani A., Patel B. A. and Mishra Sabita B. "Oxidation of thiourea and substituted thioureas". *J. Sulfur Chem.*, **32**, p.171-197 (2011).
- [24] Saeed S., Rashid Naghmana, Jones Peter G., Alli Muhammad, Hussain R. "Synthesis, characterization and biological evaluation of some thiourea derivates bearing benzothiazole moiety as potential antimicrobial and anticancer agents". *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, p.1323–1331 (2010).
- [25] Shusheng Z., Tianrong Z., Youfeng X., Bo Y. "Simple and efficient synthesis of novel glycosyl thiourea derivates as potential antitumor agents". *Eur. J. Med. Chem.* **43**, p.2778-2783 (2008).
- [26] Trotti V. J., Colevas A., Setser A. D., Rusch D., BudachC., Langer, C., Murphy B., Cumberlin R. "Seminars in radiation oncology". *Elsevier*, **13**, p. 175-380 (2003).
- [27] Uckun Faith M., D'Cruz O. "Phenethyl-5-bromopyridilthiourea (PBT) and dyhydroalkoxybenzyloxypyrimidine (DBABO) derivates exhibiting spernicidal activity". Patent US 6376504 B1 (2002).
- [28] Venkatesh P., Pandeya S. N. "Synthesis and anti-oxidant activity of some N-benzamide and heterocycle based thiourea derivates". *Int. J. Chem Tech Res.*, **1**, p.733–741 (2009).
- [29] Erben M. F. "Acetil tioureas. Propriedades estruturales y conformacionales". *An. Acad. Nac. Cs. Ex., Fís. y Nat.*, **64**, p.93–105 (2012).
- [30] Shakeel A., Altaf Ataf A., Qureshi Ashfaq M., Badshah A. "Thiourea Derivatives in Drug Design and Medicinal Chemistry". *J. Drug Des. Med. Chem.*, **2**, p.10–20 (2016).
- [31] Saeed S., Rashid Naghmana, Wong Wing-Tak. "N-cyclohexyl-n'-(4-nitrobenzoyl) thiourea". *Acta Crystallographica Section E* **66**, p.1031-1032 (2010).
- [32] Sandhyamayer Sahu, Sahoo Rani, Mishra B. K. "Oxidation of Thiourea and Substituted Thioureas". *J. Sulfur Chem.*, p.171-198 (2011).
- [33] Binzet Gün, Kavak Gülten, Külcü Nevzat, Özbey S. and Arslan H. "Synthesis and characterization of novel thiourea derivates and their nickel and copper complexes". *J.*

Chem., p.1-9 (2013).

- [34] Bedane K. G. and Singh G. S. "Reactivity and diverse synthetic applications of acyl isothiocyanates". *Arkivoc*, **4**, p. 206–245 (2015).
- [35] Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W. and Feeney P. J. "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, p. 3–26 (2001).
- [36] Lipinski C. and Hopkins A. "Navigating Chemical space for biology and medicine". *Nat. J. Science*, **432**, p. 855-861 (2004).
- [37] Douglas Pires E. V., Blundell Tom L., Ascher David B. "pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures". *J. Med. Chem.* p. 4066–4072 (2015).
- [38] Li Jack Jie, Limberakis Chris, Pflum Derek A. "Modern Organic Synthesis in the laboratory". *Oxford University Press* (2007).
- [39] Haydon David John, Palmer Nicholas, Mitchell Dale Robert, Ladduwahetty T. "Antibacterial compositions", Patent WO2007/148093 (2007).
- [40] Srinivas Kresara, Parvathaneni, Saiprathima, Mandapati, Rao M. *Tetrahedron Let.*, **55**, p. 6769–6772 (2014).
- [41] Takasu Kiyosei, Pudhom Khanitha, Kaiser Marcel, Brun Reto, Ihara M. "Synthesis and antimalarial efficacy of Aza-fused Rhodacyanines in vitro and in the P. berghei Mouse model". *J. Med. Chem.*, **49**, p. 4795-4798 (2006).
- [42] Gopal L. Khatik, Kaur Jasmine, Kumar Varun, Tikoo Kulbhushan, Vipin Nair A. "Synthesis of aryl isothiocyanates". *Eur. J. Med. Chem.* **46**, p. 3291–3301 (2011).
- [43] Brito Tiago O., Sousa Aline X., Mota Yane C. C. "Design, synthesis and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest". *Royal Soc. Chem.* **5**, p. 44507–44515 (2015).
- [44] Barnikov Doz G., Bödeker J. "Isothiocyanate". *J. fuer Prakt. Chem.*, **313**, p. 1148–1154 (1971).
- [45] Singh Raushan K., Mandal Tanmay, Viaene Tajae, Leedahl Travis, Sule Nitesh, Cook G. "Histone deacetylase activators: N-acetylthioureas serve as highly potent and isozyme selective activators for human histone deacetylase-8 on a fluorescent substrate". *Bioorg. Med. Chem. Let.* **21**, p. 5920–5923 (2011).
- [46] Weiqun Zhou, Wen Yang, Li Hua Qiu, Yong Zhang, Zhengfeng Y. "Structures and Vibrational spectra of the N-benzoyl N-dialkylthiourea derivative and their complexes with Hg (II)". *J. Mol. Struct.*, **749**, p. 89–95 (2005).
- [47] Azerbaev I. N., Poplavskaya I. A., Kurmangalieva R. G. "Reaction of α -chloro- α -isonitrosoacetone with aminopyridines". *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **14**, p. 1241-1245 (1978).
- [48] Sarkis George Y., Faisal, Essam D. "Synthesis and Spectroscopy properties of some new N,N'-disubstituted thioureas of potential biological interest". *J. Heter. Chem.*, **22**, p. 137–140 (1985).
- [49] Hayasaka Hideki, Takano Toshiyuki, Satake T. "Dimerized Thiourea derivates, near infrared absorbents comprising the same and heat wave shielding materials comprising the same". Patent EP 0611754 A1.
- [50] Goerdler J., Ohm J., Tegmeyer O., "Darstellung und Eigenschaften des 1,2,4- und des 1,3,4-thiodiazols". *Chemische Berichte*, **89**, (1956).

- [51] Singh N. B. "Synthesis of new unsymmetrical 1,3-disubstituted thioureas". *Agric. Bio. Chem. J.* **42**, p. 1285–1286 (1978).
- [52] Kalvinsh, Shlenëv R. "Chemistry of Heterocyclic Compounds". *J. Chem. Soc.* , p. 2815–2818 (1967).